



# **Parodontite et inflammation : approche clinique et biologique du rôle du lymphocyte B**

Julien Demoersman

## **► To cite this version:**

Julien Demoersman. Parodontite et inflammation : approche clinique et biologique du rôle du lymphocyte B. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. ⟨NNT : 2018BRES0026⟩. ⟨tel-01884807⟩

**HAL Id: tel-01884807**

**<https://theses.hal.science/tel-01884807v1>**

Submitted on 1 Oct 2018

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

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



HAL Authorization

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : *Immunologie*

Par

**Julien DEMOERSMAN**

## Parodontite et inflammation : Approche clinique et biologique du rôle du lymphocyte B

**Thèse présentée et soutenue à Brest le 27 juin 2018**

**Unité de recherche :** laboratoire d'immunologie LBAI UMR 1227 EA 2216, Université de Bretagne Occidentale  
Laboratoire d'Immunologie - CHRU Morvan, 5 avenue Foch - BP 824, 29609 BREST CEDEX

### Rapporteurs avant soutenance :

**Pr Marjolaine GOSSET**  
PU-PH, Université Paris-Descartes

**Pr Hubert MAROTTE**  
PU-PH, Université Jean Monnet

### Composition du Jury :

**Dr Moncef ZOUALI**  
DR, INSERM U430, Président

**Pr Marjolaine GOSSET**  
PU-PH, Université Paris-Descartes

**Pr Hubert MAROTTE**  
PU-PH, Université Jean Monnet

**Pr Hervé BOUTIGNY**  
PU-PH, Université de Bretagne Occidentale

**Pr Jacques Olivier PERS**  
PU-PH, Université de Bretagne Occidentale, Directeur de thèse

**Pr Assem SOUEIDAN**  
PU-PH, Université de Nantes, Co-directeur de thèse





# **Parodontite et inflammation : approche clinique et biologique du rôle du lymphocyte B**

**Julien DEMOERSMAN**

*Celui qui, en présence d'un profit à retirer, se rappelle la justice ; qui, en face du danger, risque sa vie, qui, même après de longues années, n'oublie pas ses engagements ; celui-là peut aussi être considéré comme un homme accompli. »*

Confucius, *Lun Yu – Les Entretiens de Confucius*

## Liste des abréviations

|   |   |
|---|---|
| <i>Aa</i> : <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>                | stimulating factor                                      |
| Ac : Anticorps  | HEVs : High Endothelial Veinules                        |
| ADAM : A disintegrin and metalloproteinase                              | HSC : Hematopoietic Stem Cells                          |
| Ag : Antigène   | ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule                |
| AID : Activation-Induced cytidine deaminase                             | ICOS : inducible costimulator                           |
| APRIL : A proliferation-inducing ligand                                 | IFN- $\gamma$ : Interferon-gamma                        |
| BAFF : B-cell activating factor   | Ig- : Immunoglobuline                                   |
| Bcl6 : B Cell Lymphoma 6  | IL- : Interleukine                                      |
| BCMA : B-cell maturation antigen  | ILC : Innate Lymphoid Cells/ Cellules lymphoïdes innées |
| BCR : B Cell Receptor   | iNKT : Invariant NK T cell                              |
| BLIMP-1 : B-lymphocyte-induced maturation protein 1                     | IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4                   |
| BTK : Bruton's Tyrosine Kinase  | LB : Lymphocyte B                                       |
| CAL : Clinical Attachment Loss/ Perte d'attache                         | LB-Fo: LB folliculaires                                 |
| CCL- : C-C Chemokine Ligand   | LB-ZM : LB de la zone marginale                         |
| CCR- : C-C Chemokine Receptor type                                      | LECAM-1 : Lymphocyte Endothelial Cell Adhesion          |
| CD- : Cluster de Differentiation  | LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen          |
| CG : Centre Germinatif  | Lin28b : Lin-28 homologue b                             |
| CGF : Crevicular Gingival Fluid / fluide gingival                       | LN : Ganglions lymphatiques ou lymphonœuds              |
| CIA : Collagen Induced Arthritis  | LPS : Lipopolysaccharide                                |
| CMG : cellules mononucléaires gingivales                                | LT : Lymphocyte T                                       |
| CMH : Complexe Majeur d'histocompatibilité                              | LTfh : LT follicular helper                             |
| CR3 : complement receptor 3, qui se lie au C3d                          | LTfr : LT follicular regulatory cells                   |
| CTL4A : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4                     | LTi : Lymphoid tissue inducer                           |
| CXCL- : C-X-C Chemokine Ligand  | LTo: Lymphoid Tissue organizer                          |
| CXCR- : C-X- C Chemokine Receptor type                                  | Mac-1 : Macrophage-A antigen                            |
| DCP : common-Dendritic Progenitor                                       | MAML1 : Mastermind-like 1                               |
| DcR3 : Decoy Receptor 3   | Mc-1 : Melanocortin 1                                   |
| DCs : Dendritic Cells /Cellules Dendritiques                            | MCSF : Macrophage colony-stimulating factor             |
| fDCs : Follicular Dendritic Cells / Cellules dendritiques Folliculaires | MMP : Matrix Metalloproteinase                          |
| FoxO1 : Forkhead box protein O1   | Mo : Macrophages  |
| FoxP3 : Forkhead box P3   | NK : Natural Killer T cells                             |
| FVB : Facteurs de Virulence Bactériens                                  | OB : Ostéoblaste  |
| GITR : Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor           | OC: Ostéoclaste   |
| GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-                                 | OPG : osteoprotegerine                                  |
|   | PB : Polynucéaires Neutrophiles                         |
|   | PD : Pocket Depth/ profondeur de poche                  |
|   | PD-1 : Programme cell Death-1                           |

*Pg* : *Porphyromonas gingivalis*  
 PNAd : Peripheral Node Addressin  
 PPAD : Porphyromonas gingivalis  
 peptidylarginine deiminase -  
 PO : Précurseurs Ostéoclastiques  
 RANK : Receptor Activator of Nuclear  
 Kappa Beta  
 RANKL : Receptor Activator of Nuclear  
 Kappa Beta Ligand  
 reg : régulateur  
 ROR- $\gamma$ t : RAR-related orphan receptor  
 gamma t  
 ROS : Radicaux libres Oxygénés  
 rTEM : resident T Effector Memory cells  
 S1P : sphingosine 1-phosphate  
 S1PR1 : sphingosine 1-phosphate recepeteur  
 -1  
 SIVA1 : Apoptosis regulatory protein Siva

T-Bet : T-box transcription factor  
 TACE : TNF- $\alpha$  Converting Enzyme  
 TACI : transmembrane activator and CAML  
 interactor  
 TCM : T Central Memory cells  
 TCR : T Cell Receptor  
*Td* : *Treponema denticola*  
 TEM : T Effector Memory cells  
 TERMRA : T Effector Memory RA  
*Tf* : *Tannerella forsythia*  
 TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor-beta  
 TLR : Toll Like Receptor  
 TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosing Factor- alpha  
 TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing  
 ligand  
 TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaiterais remercier le Pr Jacques Olivier PERS, mon directeur de thèse, pour son accueil dans le laboratoire d'immunologie de Brest, son intérêt et son implication dans cette thèse. Merci de m'avoir permis d'explorer en profondeur l'aspect immunologique de la parodontite, maladie que je traite quotidiennement, à travers ce travail sur le lymphocyte B.

Je remercie également le Pr Assem SOUEIDAN, mon codirecteur de thèse, pour toutes ces années de suivi et de soutien, notamment sur cette thèse et sur mes activités antérieures (master 2, activités hospitalo-universitaires...).

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire de Brest pour leur aide précieuse dans la mise en place et l'organisation des manip de thèse. Je pense notamment au Dr Pierre POCHARD et sa participation importante dans le traitement des échantillons et l'analyse des données. Sans toi, cette thèse ne serait pas.

Je remercie mes cothésards pour leurs conseils et leur soutien, notamment le Dr Quentin SIMON qui m'a épaulé dans l'utilisation du cytomètre et l'analyse des données.

Je remercie le Dr Camille FRAMERY pour son aide essentielle dans le recrutement des patients et des données lors de son externat, et les infirmières du CSD, notamment Madame Anne LE BRAS pour les prélèvements sanguins.

Je remercie les membres des départements de Parodontologie et de Chirurgie Buccale de Brest, notamment les Prs Hervé BOUTIGNY et Sylvie BOISRAMÉ, pour leurs aides et le partage de leurs expériences. J'ai également une pensée particulière pour les Drs Juliette COAT et Sébastien BEUZIT, pour leur participation à ce travail.

Je remercie mes collègues et amis du département de Parodontologie de Nantes, les Drs Christian VERNER, Xavier STRUILLOU, Zahi BADRAN et Marie Caroline BAUDRION pour leur soutien et leur écoute.

Je remercie la SNCF de ne pas avoir été trop souvent en grève quand j'allais au laboratoire, mais je ne les remercie pas d'avoir oublié de créer une ligne directe Nantes-Brest.

Je remercie l'hôtel LITTLE LODGE d'avoir été un peu un deuxième chez moi lors de mes séjours Brestois.

Je remercie mes parents et mes beaux-parents pour leur soutien, même s'ils n'ont pas toujours compris sur quoi je travaillais.

Enfin, je te remercie Aurélie, pour ta patience et de m'avoir supporté pendant ces 5 dernières années. Tu as tellement su gérer nos enfants, Inès et Enaël, nés au début et pendant ce travail. Vous m'avez tant manqué lorsque j'étais à la fin de la terre.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>I Maladies parodontales : un enjeu de santé publique .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>1- Classifications des maladies parodontales .....</b>  | <b>13</b> |
| a- Classification d'Armitage 1999 .....  | 13        |
| b- Classification de Page & Ecke 2012 .....  | 14        |
| <b>2- Épidémiologie des maladies parodontales : une prévalence importante.....</b>                                       | <b>16</b> |
| <b>3- Maladies parodontales et maladies systémiques : liens mono et bidirectionnels.....</b>                             | <b>17</b> |
| <b>4- Maladies parodontales et maladies systémiques : immunothérapies et parodontites .....</b>                          | <b>18</b> |
| <b>5- Prise en charge des maladies parodontales : vers une médecine personnalisée .....</b>                              | <b>18</b> |
| <b>II Maladies parodontales : Mécanismes étiopathogéniques .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>1- Biofilm.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>2- Biofilm et interactions avec l'hôte.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>3- Dysbiose et dysrégulation : rôles de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> .....</b>                                     | <b>22</b> |
| <b>4- Classification anatomopathologique de Page et Schroeder, 1976 .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>5- Ostéoimmunologie : importance de l'axe RANKL/RANK/OPG dans la perte osseuse et le système immunitaire .....</b>    | <b>27</b> |
| a- Le métabolisme osseux.....  | 27        |
| b- La triade RANK-RANKL-OPG.....   | 28        |
| c- Les cellules immunitaires.....  | 30        |
| c.1- Les polynucléaires neutrophiles (PN).....   | 30        |
| c.2- Les macrophages (Mo).....   | 31        |
| c.3- Les cellules dendritiques (DCs) .....   | 32        |
| c.4- Les lymphocytes T (LT).....   | 35        |
| c.4.1 LT effecteurs et LT mémoires.....  | 36        |
| c.4.2 Rôles des lymphocytes T auxiliaires CD4 <sup>+</sup> (Th) dans la parodontite.....                                 | 38        |
| c.4.2.1 Sous-populations de LT auxiliaires dans les parodontites .....   | 39        |
| c.4.2.1.1 Les LTh1.....  | 39        |
| c.4.2.1.2 Les LTh2.....  | 39        |
| c.4.2.1.3 Les LTh17 .....  | 39        |
| c.4.2.1.4 Les LTregs .....   | 40        |
| c.4.2.1.5 Les LTfH .....   | 42        |
| c.4.2.1.6 Les LTh22 et les LTh9.....   | 42        |
| c.4.2.2 Equilibre LTh1/LTh2 et LTh17/LTReg dans les parodontites.....  | 43        |
| c.4.3 Rôles des lymphocytes T cytotoxiques dans les parodontites.....  | 44        |
| c.4.4 Rôles des cellules lymphoïdes innées (ILC) dans les parodontites.....  | 45        |
| c.4.4.1 Les Natural Killer (NK) dans les parodontites .....  | 46        |
| c.4.4.2 Les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$ ).....   | 47        |
| c.5- Les lymphocytes (LB).....   | 47        |
| <b>6- Organisation du réseau cellulaire immunitaire au sein des tissus parodontaux.....</b>                              | <b>48</b> |
| <b>III Le lymphocyte B : acteur majeur des maladies parodontales.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>1- Ontogenèse des LB.....</b>   | <b>54</b> |
| a- Ontogenèse des LB1.....   | 54        |
| a.1 Développement dans le foie fœtal.....  | 54        |
| a.2 Développement dans les tissus périphériques .....  | 55        |
| a.3 Phénotypes et fonctions des LB1.....   | 56        |
| a.3.1 Production des Ac naturels.....  | 57        |
| a.3.2 Réponse des LB1 aux signaux perçus par les TLR : production de cytokines, phagocytose et présentation de l'Ag..... | 59        |
| a.3.3 Stimulation des réponses des LT.....   | 60        |
| a.3.4 Régulation des réponses des LT .....   | 60        |
| a.3.5 Différences LB1/LB2 .....  | 61        |
| b. Ontogenèse des LB2.....   | 61        |

|   |           |
|---|-----------|
| b.1 Génération de LB immatures dans la moelle osseuse.....  | 61        |
| b.2 Migration des LB vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS).....   | 63        |
| b.2.1 Les LB transitionnels.....  | 63        |
| b.2.2 Les LB pré-naïfs.....   | 64        |
| b.2.3 Les LB naïfs.....   | 65        |
| b.3 Activation des lymphocytes B dans les OLS.....  | 65        |
| b.3.1 Stimulation par le BCR.....   | 65        |
| b.3.1.1 Signal tonique du BCR.....  | 65        |
| b.3.1.2 Interactions LT-LB : réponse thymo-dépendante .....   | 66        |
| b.3.1.3 Formation des centres germinatifs (CG) .....  | 66        |
| b.3.2 Stimulation du lymphocyte B T-indépendante.....   | 67        |
| b.4 Dynamique des lymphocytes B dans les centres germinatifs.....   | 68        |
| b.4.1 Les lymphocytes B folliculaires .....   | 69        |
| b.4.2 Les lymphocytes B de la zone marginale.....   | 70        |
| b.4.3 Mécanismes d'exclusion cellulaires des lymphocytes B dans le centre germinatif .....  | 70        |
| b.4.4 Cellules sécrétrices d'anticorps : les plasmablastes et plasmocytes .....   | 71        |
| b.4.5 Les lymphocytes B mémoires.....   | 72        |
| b.5 Régulation de la différenciation lymphocytaire .....  | 73        |
| <b>2- Phénotype hétérogène des LB : les B régulateurs.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>3- Lymphocytes B et inflammation chronique.....</b>  | <b>75</b> |
| <b>4- Lymphocytes B et maladies parodontales.....</b>   | <b>76</b> |
| 1974-1979 : Les parodontites sont dues à une conversion d'une lésion stable T en une lésion B.  | 76        |
| 1976 : les plasmocytes, locataires majoritaires des lésions parodontales. ....  | 77        |
| - sécrétions d'immunoglobulines.....  | 77        |
| - sécrétions des matrix métalloprotéinase (MMP) et dégradation de la matrice extracellulaire.....   | 78        |
| - sécrétions de cytokines par les plasmocytes, et les LB également. ....  | 79        |
| 1984 : Les LT régulent anormalement les LB dans les parodontites.....   | 79        |
| 1988 : Les lymphocytes B peuvent activer les lymphocytes T dans les parodontites.....   | 80        |
| 1989 : Les lymphocytes B peuvent induire l'ostéoclastogénèse dans les parodontites.....   | 81        |
| - Les premières preuves du rôle des LB dans l'ostéoclastogénèse.....  | 81        |
| - Le rôle de RANKL exprimé par les LB activés dans l'induction de l'ostéoclastogénèse.....  | 82        |
| - Le LB est l'orchestrateur de l'ostéoclastogénèse dans les maladies parodontales.....  | 82        |
| - rôles des cytokines .....   | 84        |
| - rôles des facteurs bactériens .....   | 85        |
| - Les rôles des DCs et des LT.....  | 86        |
| 1992 : Les B CD5 <sup>+</sup> en parodontologie – auto-immunité B dans les parodontites .....   | 86        |
| 2004 : La circulation des LB a un rôle dans les parodontites.....   | 87        |
| 2017 : LB régulateurs ou B10 dans la parodontite.....   | 88        |
| <b>IV Auto-immunité dans les maladies parodontales.....</b>   | <b>92</b> |
| 1- Immunité et auto-immunité.....   | 92        |
| 2- Mécanismes auto-immuns dans les maladies parodontales.....   | 93        |
| <b>V Objectifs de la thèse .....</b>  | <b>97</b> |
| <b>ARTICLES .....</b>   | <b>99</b> |
| Article 1 : Prise en charge des patients sous immunothérapie. (publié) .....  | 100       |
| Résumé article 1.....   | 113       |
| Discussion .....  | 113       |
| Article 2 : Interleukin 6 receptor inhibitor tocilizumab reduce TNF- $\alpha$ concentration in gingival crevicular fluid of rheumatoid arthritis patients with periodontitis: a preliminary prospective study in twelve patients. (soumis)..... | 114       |
| Article 3 : Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. (publié) .....  | 114       |
| Résumé article 2.....   | 143       |
| Résumé article 3.....   | 151       |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Discussion .....</b>   | <b>152</b> |
| <b>1- L'utilisation d'un Ac anti-IL-6R chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde modifie le profil cytokinique dans le fluide gingival.....</b> | <b>152</b> |
| <b>2- L'utilisation d'un anti-CD20 chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde améliore l'état parodontal des patients .....</b>                  | <b>154</b> |
| a- Le CD20, cible du Rituximab.....   | 154        |
| b- Les Ac anti-CD20 améliorent l'état parodontal .....  | 155        |
| <b>Article 4 : B cell subset distribution is altered in patients with severe periodontitis. (publié) .....</b>  | <b>157</b> |
| <b>1- Création de la biocollection OdontoBrest .....</b>  | <b>157</b> |
| <b>2- Mise en place de l'étude LB PARO - PARODONTITE ET INFLAMMATION : APPROCHE CLINIQUE ET BIOLOGIQUE DU RÔLE DU LYMPHOCYTE B.....</b>                     | <b>158</b> |
| <b>3- Présentation de l'article.....</b>  | <b>158</b> |
| <b>Résumé article 4.....</b>  | <b>173</b> |
| <b>4- Résultats non présentés dans l'article .....</b>  | <b>174</b> |
| a- Matériels et méthodes.....   | 174        |
| a.1 Analyse par cytométrie en flux des cellules T circulantes .....   | 175        |
| a.2 Préparation des échantillons gingivaux.....   | 175        |
| a.3 Analyse des échantillons gingivaux. ....  | 175        |
| b- Résultats de l'analyse des populations de LT circulants .....  | 176        |
| c- Résultats de l'analyse de 4 échantillons de gencive .....  | 177        |
| <b>Discussion .....</b>   | <b>182</b> |
| <b>1- Profils immunologiques des LB dans la gencive et le sang.....</b>   | <b>182</b> |
| <b>2- Les LB mémoires sont augmentés dans le sang et les gencives des patients présentant une parodontite sévère .....</b>                                  | <b>185</b> |
| a- Pathologies où la distribution des populations sanguines de lymphocytes B est altérée .....  | 185        |
| b- Études sur les profils sanguins des patients atteints de parodontites.....   | 186        |
| c- Différents profils immunologiques de parodontite .....   | 187        |
| d- Caractéristiques des lymphocytes B mémoires dans les parodontites.....   | 188        |
| <b>3- Les LB1 CD11b<sup>+</sup> sont diminués dans le sang des patients présentant une parodontite sévère .....</b>   | <b>191</b> |
| <b>4- RANKL est présent de manière relativement plus forte sur les populations lymphocytaires.....</b>  | <b>192</b> |
| a- Expression des RANKL par les lymphocytes B mémoires switchés dans le sang.....   | 193        |
| b- Expression de RANKL par les lymphocytes B immatures et naïfs dans le sang.....   | 194        |
| <b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>   | <b>196</b> |
| <b>I Hypothèse 1 : Les différentes sous-populations des lymphocytes B dans la gencive.....</b>  | <b>199</b> |
| <b>1- Les LB dans les gencives : la description histologique dans la littérature doit être précisée.....</b>  | <b>199</b> |
| <b>2- L'organisation des cellules immunitaires dans les tissus parodontaux : ZPP et ZPS202</b>  |            |
| a- Réponse innée majoritaire dans les ZPP .....   | 203        |
| b- Réponse adaptative majoritaire dans les ZPS .....  | 205        |
| <b>3- Les LB CD5<sup>+</sup> dans le sang et les gencives : Qui sont-ils ? .....</b>  | <b>206</b> |
| <b>4- Les LB1 dans le sang et les gencives.....</b>   | <b>208</b> |
| a- Les LB1 CD11b <sup>+</sup> circulants.....   | 208        |
| b- Les LB1 CD11b <sup>+</sup> dans les gencives .....   | 209        |
| c- Les LB1 CD11b <sup>-</sup> dans les gencives.....  | 212        |
| d- Les LB10 ; en partie issus des LB1 .....   | 213        |
| e- LB1 et induction de l'ostéoclastogénèse .....  | 214        |
| f- LB1 et augmentation des LB CD5 <sup>+</sup> dans certaines formes de parodontites .....  | 215        |



|   |            |
|---|------------|
| <b>II Hypothèse 2 : Présence d'organes lymphoïdes tertiaires dans les maladies parodontales ?</b> | <b>216</b> |
| <b>1- Caractéristiques des organes lymphoïdes tertiaires</b>                                      | <b>217</b> |
| <b>2- Développement des OLT</b>   | <b>218</b> |
| a- Développement des OLT : rapprochements avec les parodontites                                   | 219        |
| b- OLT dans les parodontites  | 223        |
| c- OLT dans la gencive proche des OLT dans les fat-associated lymphoid clusters (FALCs) ?         | 224        |
| <b>3- Rôle de l'axe RANK-RANKL-OPG dans le développement des OLT</b>                              | <b>224</b> |
| <b>III Hypothèse 3 : La réponse immunitaire B dans les parodontites</b>                           | <b>227</b> |
| <b>IV Conclusion et perspectives d'études</b>   | <b>233</b> |
| <b>ANNEXES</b>  | <b>236</b> |
| Annexe 1 : Calcul automatisé du diagnostic Page et Ecke   | 237        |
| Annexe 2 : Protocole d'étude ParoPar  | 238        |
| Annexe 3 : Protocole d'étude LBPARO   | 242        |

## INTRODUCTION

Les parodontites sont des maladies inflammatoires chroniques d'origine infectieuse [1]. Elles se caractérisent par une destruction des tissus de soutien de la dent (os, ligament, gencive) pouvant aller jusqu'à la perte de l'organe dentaire. La perte d'attache, la formation d'une poche parodontale et la perte osseuse sont des caractéristiques cliniques d'une parodontite. Ces destructions font suite à la gingivite qui est une inflammation des tissus superficiels et qui est réversible [1-3]. Les raisons du passage d'une gingivite (inflammation avec absence de destruction tissulaire) à une parodontite (inflammation gingivale avec destruction tissulaire) ne sont pas encore complètement élucidées [3-11]

Depuis, les travaux sur la gingivite expérimentale de Loe et al. en 1965 [7], le rôle étiologique du biofilm est démontré dans l'induction de l'inflammation gingivale et par la suite d'une parodontite [9]. Par ailleurs, la vision d'un processus uniquement local au niveau de la cavité buccale a été dépassée avec l'extension des connaissances en microbiologie et en immunologie sur les maladies parodontales, pour aboutir à une vision plus globale et systémique de l'atteinte parodontale [6, 12-14]. En effet, il est établi que la présence d'une inflammation chronique parodontale a des répercussions systémiques. La production locale et la circulation des cytokines proinflammatoires à partir du chorion gingival influencent directement la lymphopoïèse et la myélopoïèse à partir des cellules souches hématopoïétiques, et induisent une lymphopoïèse extra médullaire, dans les tissus en périphérie [15].

Le biofilm ou plaque dentaire est constitué d'une population bactérienne organisée en un écosystème qui entretient des relations complexes avec le système immunitaire et l'environnement [2, 4, 8, 16, 17]. De nombreuses études ont exploré la composition et l'évolution du biofilm dans les maladies parodontales sans jamais distinguer un pathogène spécifique aux différentes formes parodontites, ni même spécifique à une parodontite [18-20]. Cependant, des bactéries Gram négatives anaérobies, telles que le *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), ou *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), *Treponema denticola* (*Td*), ont été décrites comme étant parodontopathogènes et semblent avoir un rôle important dans l'étiopathogénie des maladies parodontales [5, 6, 16, 21-23]. Cependant, leur présence, seule, ne peut expliquer l'apparition d'une parodontite [8]. En effet, *Pg*, mais également *Aa* et d'autres bactéries parodontopathogènes ont été décrites chez des patients ne présentant pas de parodontite ou dans des sites sains, mais avec une charge bactérienne bien moins importante que dans les parodontites [24, 25].

Socransky et al. en 1998 [20] ont décrit l'organisation des bactéries au sein du biofilm sous forme de complexes bactériens dans les parodontites chroniques. Le complexe rouge notamment, constitué de *Pg*, *Tf* et *Td* a souvent été associé aux formes agressives de parodontite, selon la classification d'Armitage en 1999 [18, 26], mais aucune étude n'a mis en évidence une corrélation forte entre le type de parodontite, la composition du biofilm et le niveau de la charge bactérienne [19]. Les facteurs de risque peuvent influencer sur l'installation et l'évolution de la parodontite ainsi que sur sa sévérité, mais la réponse immuno-inflammatoire, caractéristique de l'hôte, est un élément déterminant dans la mise en place d'une parodontite [2, 4, 8, 16, 17, 27-29, 30]

La réaction immuno-inflammatoire mêle des interactions entre la réponse innée, non spécifique, et la réponse adaptative ou spécifique. Elle est responsable des destructions tissulaires. Parmi les nombreux acteurs de la réaction immuno-inflammatoire face au biofilm bactérien, le lymphocyte B(LB), cellule immunitaire centrale de l'immunité adaptative a été peu étudié. Depuis 40 ans, le LB semble être un acteur important de la mise en place des destructions tissulaires : la parodontite semble être caractérisée par une conversion cellulaire d'une lésion à lymphocyte T(LT) majoritaire, dans la gingivite, à une lésion LB majoritaire [31, 32]. Le LB semble avoir un rôle complexe, à la fois protecteur et destructeur [33, 34] et essentiel dans l'évolution des maladies parodontales [3]. En effet, il a été observé que son absence ou sa déficience chez l'animal peut amener à une absence de destruction tissulaire [35-37].

La prolifération et le développement des différents acteurs de la réponse immuno-inflammatoire, notamment des LB au cours de la parodontite sont dépendants de l'environnement cytokinique [34, 38]. En effet, il a été observé que l'utilisation d'immunothérapies, ou biothérapies dans les traitements des maladies auto-immunes est susceptible d'influer la réaction inflammatoire dans les parodontites [39, 40].

L'objectif de ce travail est d'étudier le rôle du LB dans l'étiopathogénie des maladies parodontales. La prévalence de ces maladies est importante et les classifications proposées ces dernières décennies ne permettent pas de définir objectivement toutes les particularités des maladies parodontales. Elles entretiennent des relations parfois bidirectionnelles avec d'autres maladies inflammatoires et/ou auto-immunes et leur prise en charge pourrait faire appel aux principes d'une médecine personnalisée, éventuellement centrée sur la modulation du LB. Les LB interviennent à tous les niveaux dans la mise en place des maladies parodontales, notamment au niveau de l'interface immunosquelettique, où le système immunitaire et le métabolisme osseux interagissent. De même, les LB sont impliqués dans la composante auto-immune des parodontites.

## I Maladies parodontales : un enjeu de santé publique

### 1- Classifications des maladies parodontales

Au cours des dernières décennies, devant le polymorphisme important des maladies parodontales, plusieurs classifications se sont succédées, et ont comme point commun de se baser sur les caractéristiques cliniques observées [41]. La dernière classification officielle en date est celle présentée par Armitage GC après une conférence de consensus en 1999 [26, 41, 42]. Page & Ecke en 2007 et 2012 ont proposé une nouvelle classification des maladies parodontales, que nous avons utilisée pour nos études cliniques (articles 2, 3 et 4). Nous allons discuter de leurs intérêts et caractéristiques.

#### **a- Classification d'Armitage 1999**

La classification d'ARMITAGE 1999 visait à modifier la précédente classification des maladies parodontales datant de 1989 [26, 41]. Elle permet de s'affranchir de critères non validés scientifiquement par les précédentes classifications, comme l'âge, et d'éliminer les catégories hétérogènes comme les parodontites réfractaires, les parodontites à progression rapide ou les parodontites prépubertaires [41]. Elle intègre également une classification des maladies gingivales et les parodontites associées à des maladies systémiques, telles que le diabète, et les atteintes gingivales et parodontales nécrosantes.

Elle distingue plus particulièrement les parodontites chroniques, à évolution lente, des parodontites agressives, à évolution plus rapide, avec une forte composante héréditaire et prend en compte leur extension (généralisée et sévère) et leur degré de sévérité (légère, modérée, sévère) pour les parodontites chroniques. Les critères des parodontites agressives ont été précisés, discutés et amendés par la suite [43-45], mais cette dichotomie clinique des maladies parodontales (chroniques/agressives) n'est pas corrélée avec des caractéristiques biologiques majeures, histopathologiques, immunologiques ou microbiologiques spécifiques de chaque entité [18, 19, 44, 46, 47].

Presque 20 ans après sa mise en place, cette classification paraît insuffisante. Elle souffre d'une certaine subjectivité au niveau du diagnostic clinique et les comparaisons entre les études sont rendues difficiles, car les définitions des maladies parodontales ne sont pas toujours uniformes [18]. Il est par ailleurs nécessaire de la faire évoluer afin d'intégrer les aspects moléculaires, microbiologiques, génétiques, épigénétiques et immunitaires aux caractéristiques cliniques des parodontites chroniques et agressives. Ainsi, mieux comprendre

l'étiopathogénie des maladies parodontales, notamment la réponse de l'hôte, permettra de mieux diagnostiquer et de mieux traiter.

## **b- Classification de Page & Ecke 2012**

Page et Ecke en 2007 proposèrent une nouvelle classification des maladies parodontales se basant uniquement sur les mesures cliniques de perte d'attache (CAL) et de profondeurs de poche (PD). Devant la pléthore de définitions des maladies parodontales, rendant les différentes études difficilement comparables [18, 48], ils décidèrent de ne pas prendre en compte les facteurs de risque, et les indices cliniques d'inflammation (BOP) et de plaque, l'extension des atteintes (localisées ou généralisées) ni la mobilité dentaire. La plupart des caractéristiques des maladies parodontales sont définies de manière empirique et divergent suivant les auteurs [48]. Pour Page et Ecke, les critères de définition des parodontites doivent être quantitatifs, spécifiques, facilement mesurables et relativement faibles en nombre pour rendre les études plus facilement comparables.

Les auteurs constatent que dans la classification d'Armitage 1999 [26], 95 % des diagnostics cliniques de parodontites sont des parodontites chroniques et agressives [48]. Les autres catégories sont très rares et sont principalement observées chez des patients ayant un déficit immunitaire. Ainsi, pour la classification des pathologies parodontales, ils proposent de ne pas distinguer les atteintes chroniques et agressives.

Pour Page et Ecke, les mesures retenues pour le diagnostic sont celles situées uniquement au niveau des sites interproximaux. Les atteintes parodontales débutent généralement au niveau de ces sites, et l'effet d'une récession gingivale est minimisé par rapport aux sites vestibulaires et linguaux. De même, ce sont généralement les sites où les atteintes sont les plus sévères. Un minimum de deux sites avec  $CAL \geq 6\text{mm}$ , mais pas sur la même dent est requis, car il est possible d'avoir des pertes d'attache sévères pour des raisons non parodontales (fractures, fêlures radiculaires, lésions endoparodontales). Enfin, il est important de prendre en compte à la fois les valeurs de perte d'attache et de profondeur de poches, car ne prendre en compte que les pertes d'attache risque d'inclure quelques sites parodontalement sains avec une perte d'attache, et une récession gingivale non inflammatoire (origine traumatique ou suite à un traitement parodontal mené avec succès). De même, ne prendre en compte que les poches risque de sous-estimer la prévalence des parodontites, notamment chez les personnes âgées, où les récessions gingivales, pour raisons parodontales, sont plus fréquentes que chez les personnes jeunes. Ainsi, un minimum de 1 site avec  $PD \geq 5\text{ mm}$ , associé à 2 sites avec un  $CAL \geq 4\text{ mm}$  est requis pour le diagnostic d'une parodontite,

excluant par conséquent les patients ayant été traités avec succès, et les patients ayant des pertes d'attache pour des raisons non parodontales [48].

| <b>Définitions cliniques proposées par le groupe de travail du CDC pour surveiller les parodontites dans la population - troisième molaire exclue -</b> |   |    |  |
|---|---|----|--|
| <b>Catégorie de maladie</b>   | <b>Perte d'attache (CAL)</b>                                  |    | <b>Profondeur de poche (PD)</b>  |
| <b>Parodontite sévère</b>   | ≥2 sites interproximaux avec CAL ≥6 mm (pas sur la même dent) | et | ≥1 site interproximal avec PD ≥5 mm  |
| <b>Parodontite modérée</b>  | ≥2 sites interproximaux avec CAL ≥4 mm (pas sur la même dent) | ou | ≥2 sites interproximaux avec PD ≥5 mm (pas sur la même dent)                         |
| <b>Parodontite légère</b>   | ≥2 sites interproximaux avec CAL ≥3 mm,                       | et | ≥2 sites interproximaux avec PD ≥4 mm (pas sur la même dent) ou 1 site avec PD ≥5 mm |
| <b>Absence de parodontite</b>   | Ni parodontite «modérée» ni «sévère» ou «légère»              |    |  |

***Tableau 1 - Classification de Page Eke 2012 : Critères de diagnostic des atteintes légères, modérées ou sévères et des absences de parodontite. [48, 49]***

Cette classification, revue en 2012 [49], distingue quatre entités de parodontites avec des caractéristiques précises de profondeur de poches et de perte d'attache (Tableau 1). Cela permet d'avoir des critères objectifs de définition des parodontites qui nous ont permis de développer un algorithme, via Excel (Microsoft 2011) pour le calcul automatique du diagnostic parodontal, selon Page & Eke, d'après les données du sondage parodontal (Annexe1). Cette classification a été utilisée dans les études à l'origine des articles 3 et 4, respectivement sur les répercussions des biothérapies anti-CD20 sur les parodontites et sur le phénotype des LB dans les parodontites sévères (SP).

La classification de Eke & Page 2012 a l'avantage d'être simple et précise et permet une surveillance aisée des pathologies parodontales. Cependant, elle prend en compte beaucoup moins de critères cliniques que la classification d'Armitage 1999 et est ainsi plus fine, mais aussi plus objective, car basée uniquement sur des données numériques.

## **2- Épidémiologie des maladies parodontales : une prévalence importante**

Les maladies parodontales ont des conséquences importantes sur la qualité de vie des patients. Elles sont à l'origine de la perte des dents, ce qui perturbe l'ensemble des fonctions orales [50, 51]. Depuis plusieurs décades, la prévalence des maladies parodontales est étudiée, ainsi que leurs relations avec de nombreuses maladies systémiques, notamment les maladies inflammatoires chroniques et celles ayant une composante auto-immune (polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn, spondylarthrite, psoriasis, lupus...) [13, 30, 52, 53]. Elles représentent la deuxième cause de perte dentaire, après les maladies carieuses [54-57] qui sont bien plus connues dans la population générale, et la première cause de perte dentaire chez les jeunes patients présentant une parodontite diagnostiquée [58]. La perte dentaire est souvent associée avec les atteintes parodontales sévères [57, 59].

Dans les pays occidentaux, la prévalence des maladies parodontales est d'environ 50%, et les formes sévères représentent environ 10% des parodontites [60-62]. Leur prévalence reste encore élevée, notamment dans les pays en voie de développement [63]. Ces données varient en fonction des caractéristiques ethniques (génétiques, souches particulières de certaines bactéries parodontopathogènes), et des conditions socio-économiques et culturelles [51, 53, 64]. Certains auteurs pensent que la prévalence des maladies parodontales, et les besoins en soins sont sous-estimés, et que les formes sévères pourraient représenter jusqu'à 20% de la population [51, 59, 61, 65-68].

Hugoson et al. ont suivi jusqu'en 2008 l'évolution de la prévalence des différentes formes de maladies parodontales sur plus de 30 ans. [69]. La prévalence des parodontites a diminué en Europe et aux USA avec une prise en charge importante des patients et une prévention plus efficace. Cependant, la proportion des parodontites sévères reste relativement constante, et la diminution de la prévalence des parodontites est plutôt en faveur des atteintes légères et modérées.

Il est donc important de bien connaître la prévalence des différentes formes de maladies parodontales, notamment des atteintes sévères, et leurs caractéristiques biologiques, pour déterminer les besoins en soins et mieux les cibler dans le cadre d'une médecine personnalisée.

### **3- Maladies parodontales et maladies systémiques : liens mono et bidirectionnels**

De nombreuses interactions mettent en évidence des liens étroits entre différentes affections systémiques et les maladies parodontales [13, 52, 70, 71]. Ainsi, les maladies cardiovasculaires, notamment l'athérosclérose, les diabètes de type I et II, la polyarthrite rhumatoïde (PR), les cancers, l'obésité, les broncho-pneumopathies chroniques obstructives, les accouchements prématurés et même les déficits cognitifs (Alzheimer) entretiennent une relation parfois bidirectionnelle avec les parodontites [13, 52, 70, 72-74]. Ces maladies ont pour caractéristiques d'être des pathologies inflammatoires chroniques, pour certaines auto-immunes. Les maladies parodontales semblent avoir une prévalence plus importante en présence de certaines maladies systémiques [74, 75].

Les mécanismes en jeu sont multiples et passent à la fois par des phénomènes de translocation bactérienne, de diffusion des LPS (lipopolysaccharide) dans l'ensemble des tissus, ou de cytokines proinflammatoires [71], mais probablement également par des échanges de cellules inflammatoires, notamment des LB [76]. Une inflammation systémique se met en place pour toutes les maladies systémiques et explique en partie les liens spécifiques qui existent entre elles et avec les maladies parodontales. La présence d'une inflammation chronique va être à l'origine d'une diminution de la lymphopoïèse centrale et de l'activation d'une lymphopoïèse extra médullaire [15]. Les LB transitent dans le sang et la lymphe pour passer de la moelle osseuse, aux organes lymphoïdes secondaires (OLS) et aux tissus périphériques. Ils suivent différents signaux (chimiotactisme, gradients S1P (sphingosine-1-phosphate), homing) pour rejoindre les tissus cibles [77, 78]. Les LB seraient ainsi susceptibles de passer d'un site inflammatoire à l'autre et moduler les réponses immunitaires locales [79].

Les maladies parodontales peuvent ainsi avoir un impact en favorisant l'installation, l'induction et la progression des pathologies inflammatoires chroniques. Les études sur ces dernières doivent notamment prendre en compte l'état parodontal du patient. Les LB sont impliqués dans ces pathologies ; il nous a donc semblé pertinent d'explorer le rôle du LB dans les maladies parodontales.



#### **4- Maladies parodontales et maladies systémiques : immunothérapies et parodontites**

De plus en plus de cancers, de maladies auto-immunes, notamment la PR, bénéficient de traitement par immunothérapie. L'utilisation d'anticorps thérapeutiques, ou biothérapies s'est développée pour ces pathologies afin d'avoir une action anti-inflammatoire.

Les maladies parodontales sont des maladies inflammatoires avec des répercussions systémiques, il est donc probable que certaines immunothérapies peuvent avoir des conséquences sur l'évolution d'une parodontite, qui pourraient être une voie thérapeutique nouvelle des maladies parodontales. Cependant, elles peuvent également être à l'origine de nombreux effets secondaires locaux et généraux, et sont pour le moment réservées à des pathologies lourdes et invalidantes.

Des immunothérapies locales sont utilisées depuis de nombreuses années dans le cadre de la désensibilisation aux allergènes, notamment par voie sublinguale [80]. Ces approches sont de plus en plus évoquées et testées dans le traitement des cancers [81, 82] ou des épistaxis (utilisation de bevacizumab en spray nasal, pour avoir un effet anti-angiogénique) [83, 84]. L'objectif est d'amener à une amélioration clinique de la pathologie avec une limitation des effets secondaires.

#### **5- Prise en charge des maladies parodontales : vers une médecine personnalisée**

Le concept de médecine personnalisée est déjà mis en œuvre pour le traitement des maladies systémiques, comme les pathologies rhumatismales. Il a été également proposé pour la prise en charge des parodontites [85, 86].

L'objectif d'une médecine personnalisée en parodontologie est d'adapter le suivi et le traitement parodontal à l'aide de marqueurs salivaires, comme le suggère Korte et al. en 2016 [86]. Cependant, des marqueurs sanguins pourraient être également utilisés. Dès les premiers travaux sur les LB en 1974, Mackler et al. [87] montrèrent que les LB et LT prélevés dans le sang de patients atteints de parodontite réagissaient différemment à la stimulation antigénique de la plaque dentaire. Il existe donc probablement des marqueurs phénotypiques des LB qui pourraient être corrélés au diagnostic (classification des maladies parodontales, intégrant le LB), à l'évolution et au pronostic des maladies parodontales.

## II Maladies parodontales : Mécanismes étiopathogéniques

Les destructions parodontales se mettent en place suite à de complexes interactions entre l'hôte et le biofilm. Plusieurs modèles étiopathogéniques ont été développés en fonction de l'évolution des connaissances dans les domaines de la microbiologie et de l'immunologie. Cependant, le passage d'une gingivite à une parodontite et les raisons du changement microbiologique et immunologique qui s'opère restent encore méconnus.

Depuis plus de 100 ans, la spécificité/non spécificité de l'étiologie bactérienne des maladies parodontales est discutée [9]. En 1965, Loe et al. mirent en avant le rôle étiologique du biofilm bactérien [7, 88]. Le modèle étiopathogénique présenté était alors simple : les bactéries causent les maladies parodontales. Les autres concepts étiologiques évoqués précédemment comme le traumatisme occlusal, l'environnement systémique ou l'alimentation étaient abandonnés [14].

Depuis les années 1970, certaines bactéries sont considérées comme étant responsables des maladies parodontales et semblent interagir entre elles sous forme de complexes [9, 20] au sein d'un biofilm décrit dès 1994-95 [89-91].

La réaction de l'hôte en rapport avec ces bactéries est étudiée depuis les années 1970, notamment la réponse immuno-inflammatoire [31, 32, 87, 92-94]. Page et Schroeder en 1976, puis Seymour et al. en 1979 mirent en avant que l'infiltrat de LB était important et hautement différencié dans les parodontites. Les lésions parodontales étaient caractérisées par une conversion d'une lésion stable, où les LT étaient majoritaires, vers une lésion progressive, où les LB devenaient majoritaires [31, 95]. La réponse immuno-inflammatoire est notamment constituée par une réponse innée et une réponse adaptative faisant intervenir de nombreux acteurs cellulaires et cytokines inflammatoires.

La seule présence des agents pathogènes n'est pas suffisante pour expliquer la survenue des maladies parodontales ; l'environnement et la réponse de l'hôte tiennent un rôle important [9]. Dès 1997, Page et Kornman développèrent un modèle présentant les interactions entre le biofilm et l'hôte et les relièrent aux signes cliniques des maladies parodontales [14, 96-98]. Les facteurs génétiques et épigénétiques (environnementaux et locaux) déterminent le type de parodontite et une éventuelle association avec les maladies systémiques.

Les mécanismes inflammatoires répondent à une activation bactérienne et l'écologie bactérienne du biofilm est modulée par la réponse inflammatoire. Van Dyke en 2009 insista en effet sur le rôle prépondérant de la réponse inflammatoire et son influence sur la composition et l'écologie du biofilm bactérien [11] : l'inflammation change le

microenvironnement de la poche parodontale et favoriserait le développement de *Pg* et *Tf*. Devant l'impossibilité de mettre en évidence un pathogène parodontal spécifique et systématiquement présent, il se demande si les pathogènes rencontrés dans les maladies parodontales sont les causes ou les conséquences de la maladie, en réponse aux modifications microenvironnementales.

La notion de dysbiose associée à une dysrégulation a été développée et proposée pour les parodontites par Hajishengallis et al. en 2014 [4, 99]. Le rôle subversif de certains pathogènes parodontaux sur la réponse de l'hôte, notamment *Pg*, est décrit. Il est défini comme une clé de voûte pathogène, indispensable, mais pas suffisante pour induire une parodontite. *Pg* a une action subversive et manipule la réponse de l'hôte [4, 16], orchestre la composition du biofilm et adapte ainsi la réponse inflammatoire [4].

La réponse immuno-inflammatoire joue alors un rôle majeur dans la pathogénie des maladies parodontales face au biofilm dysbiotique. Le LB est décrit depuis plus de 40 ans comme étant prépondérant dans les lésions parodontales, et sa présence souligne l'importance de la réponse adaptative.

## 1- Biofilm

Depuis plusieurs millions d'années, la flore microbienne résidente coexiste avec son hôte humain en parfaite harmonie et en symbiose dans la plupart des situations. Ce super-organisme, ou "holobiont", formé entre l'hôte et la flore bactérienne qui lui est associée, joue un rôle significatif dans la physiologie et la santé humaine. [100]. Ces bactéries s'organisent en biofilm qui colonise l'ensemble des surfaces chez l'homme, que ce soit la peau, les muqueuses, les dents et les parois intestinales ou génitales. Ce biofilm est lui-même un écosystème bactérien en perpétuelle évolution et changement [100, 101] qui pour ne pas être pathogène, voire bénéfique doit être en homéostasie, en symbiose avec son hôte, et en équilibre. [100, 102-107].

La perte d'équilibre du biofilm est la cause de nombreuses pathologies dont les parodontites [100, 101, 105, 108-111]. Les parodontites ne résultent pas de l'action d'un pathogène individuel, mais d'une synergie polymicrobienne et d'une dysbiose associée à une dysrégulation de la réponse immunitaire, hyper-inflammatoire, à l'origine des dommages tissulaires observés [4, 16, 89, 91, 103, 112, 113].

Plus de 700 espèces bactériennes sont décrites à ce jour dans la cavité buccale humaine et la salive contient  $10^8$  à  $10^9$  bactéries par  $\text{mm}^3$  [106, 107]. Un biofilm dentaire mature est constitué de plus de 100 espèces microbiennes différentes, mais il peut aussi

contenir des protozoaires, des levures et des virus [107]. La structure du biofilm est constituée de multitudes de micro-colonies bactériennes sous forme d'agrégats homo ou hétérotypiques, de formes variables en fonction des conditions environnementales, et de canaux aqueux permettant la diffusion de nutriments, l'élimination des déchets métaboliques, et la communication intercellulaire (Quorum Sensing).

Les bactéries parodontopathogènes (*Aa*, *Pg*, *Pi*, *Td*...) se développent au fur et à mesure, au détriment des autres espèces. Elles modifient la composition du biofilm mature en s'agrégeant au *Fn*, qui fait le lien avec les bactéries pionnières (streptocoques) [107, 114]. Elles s'organisent en complexes bactériens [20] afin de coopérer par l'intermédiaire d'une communication intercellulaire via des médiateurs (N-acyl homosidéridine lactone (AHL), auto inducteur 1 et 2 (AI1, AI2)...), ou l'échange d'informations génétiques intra et inter-espèces (phages bactériens) [114-119]. Ce système de communication joue un rôle prépondérant dans la structuration et la virulence du biofilm.

Des phénomènes de compétitions et de coopérations bactériennes s'opèrent au sein du biofilm [114] et des interactions ont constamment lieu entre le biofilm et l'hôte [4, 16, 111]. Par ce biais, *Pg* est un inducteur de la dysbiose et favorise la présence des espèces bactériennes du complexe rouge [20], mais il peut également modifier la virulence de bactéries de la flore commensale comme *Sg* (*Streptococcus Gordonii*) [120].

La dysbiose va donc survenir des interactions avec l'hôte et le biofilm.

## **2- Biofilm et interactions avec l'hôte**

La composition du microbiome oral est influencée par la température, le pH, le niveau d'oxygène, mais également par ses interactions avec l'hôte. L'accumulation de la biomasse microbienne au niveau de la gencive marginale est à l'origine d'une inflammation gingivale. Il en résulte une augmentation du volume de fluide gingival (CGF) permettant l'arrivée des composants de la défense immunitaire (immunoglobulines (Ig°, complément, neutrophiles, cytokines), mais également de molécules de l'hôte servant de substrats pour les bactéries protéolytiques telles que *Pg*. L'hémine contenue dans l'hémoglobine est un cofacteur essentiel à la croissance de *Pg*. Ainsi, l'augmentation du flux sanguin liée à l'inflammation favorise son développement [113, 121]. Les modifications des conditions environnementales, associées à l'inflammation vont avoir un impact sur la composition microbienne du biofilm et les interactions entre les différentes bactéries [113].

À partir de ces données, nous pouvons comprendre que l'inflammation modifie le microbiote sous-gingival, soit par l'impact sur les défenses de l'hôte, soit par la modification

des conditions environnementales, et participe à la mise en place de la dysbiose [113]. L'évolution de la composition du biofilm gingival est donc dépendante du statut inflammatoire local, mais aussi général. Ainsi, une association a été mise récemment en évidence entre le lupus érythémateux systémique (SLE) et les parodontites [74]. Les patients souffrant de SLE ont une prévalence plus importante de parodontites, notamment de formes sévères. Chez ces patients, l'inflammation locale est accrue et la composition microbienne sous-gingivale est dysbiotique, ce qui peut en partie expliquer la mise en place d'une parodontite.

### **3- Dysbiose et dysrégulation : rôles de *Porphyromonas Gingivalis***

*Pg* est présenté comme une clé de voûte pathogène dans la mise en place de la parodontite [4, 16, 103, 120], et l'induction de la dysbiose. Hajishengallis et al. ont montré [16] sur un modèle murin de parodontite expérimentale que *Pg*, même en faibles quantités, était capable d'orchestrer l'inflammation parodontale et de créer une modification de la composition microbienne du biofilm. L'augmentation de l'inflammation permet à *Pg* d'augmenter son apport de nutriments, notamment l'hémine [113, 121]. Ses facteurs de virulence, gingipaines, LPS et fimbriae sont à l'origine d'une subversion des défenses de l'hôte et de la création des conditions adéquates à son développement et à son échappement au système immunitaire [4, 16, 21, 23, 122-127]

Les gingipaines sont des cystéines protéases (Kpg, RgpA et RgpB) pouvant s'organiser en complexes. Elles vont cliver les éléments du complément et être à l'origine d'une suractivation de C5aR1, suite à une accumulation de C5a, et d'une inhibition de la conversion de C3. Les anaphylatoxines C3a et C5a et les autres produits de dégradation du C3, notamment le C3d sont ainsi dysrégulés et leurs actions pro et anti-inflammatoires perturbées, notamment le C3d sur les LB [128-130]. L'absence du récepteur 1 au C5a 1 (C5aR1) chez la souris amène à une perte de la capacité du *Pg* d'entraîner une dysbiose, suggérant ainsi le rôle majeur de *Pg* et du complément au niveau de ce mécanisme [16]. Les gingipaines hydrolysent également les IL-4 et IL-5 et modifient directement l'environnement cytokinique, et les différenciations cellulaires associées [131]. *Pg* inhibe l'expression et l'accumulation d'IL-2 et atténue ainsi la prolifération et la communication des LT, via l'action de gingipaines, mais aussi par la suppression du facteur de transcription AP-1 (Activator Protein 1), responsable de la régulation de l'expression de l'IL-2 [125, 132].

Les gingipaines exercent un effet dose dépendant sur le complément : une faible dose, comme au début de la colonisation de *Pg*, ne peut pas bloquer l'action du complément, mais

active la voie classique via une activation du complexe C1. Une forte dose, lorsque les colonies de *Pg* sont installées, inhibe la conversion du C3. L'activation du complément permet l'élimination des bactéries sensibles de la flore commensale, dont certaines sont en compétition au sein du biofilm avec *Pg*. *Pg* est particulièrement résistant à l'opsonisation et la destruction liée à l'activation du complément, et échappe à ce mécanisme.

L'autre voie d'action de *Pg* sur le système immunitaire et la modulation de l'inflammasome passe par l'action des LPS-*Pg* sur l'activation des TLR (Toll Like Receptor), notamment TLR1, TLR2 et TLR4 [133-135]. Certains auteurs ont démontré des interactions croisées entre l'action des LPS-*Pg* sur TLR2 ou 4, l'IL-1 et RANKL (Receptor Activator of Nuclear Kappa Beta Ligand) régulant l'orientation des précurseurs ostéoclastiques (PO) vers la voie ostéoclastique ou la libération de cytokines pro-inflammatoires. [23 , 124, 136].

Enfin, l'action des LPS-*Pg* stimule la prolifération des cellules souches mésenchymateuses gingivales (G-MSCs) [135] et l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire pro-inflammatoire (TLR, NF-kB, MAPK) dans les cellules épithéliales orales [137].

Ainsi, dysbiose et dysrégulation sont intimement liées et ce phénomène module l'action de chacun des acteurs de la réponse immunitaire.

#### **4- Classification anatomopathologique de Page et Schroeder, 1976**

En 1972, Page et Schroeder décrivent les évolutions histologiques de la gencive en fonction des différents stades de la parodontite [32]. À partir d'échantillons d'origine à la fois humaine et animale suite à l'induction d'une parodontite expérimentale, ils déterminèrent différentes étapes de mise en place d'une parodontite et les cellules immunitaires les caractérisant. Quatre stades de lésion furent présentés : la lésion initiale, la lésion précoce, la lésion établie et la lésion avancée (Tableau 2). Les 3 premiers stades correspondent à la mise en place d'une gingivite et le dernier, d'une parodontite.

|                                |  |             |
|--------------------------------|--|-------------|
| Lésion initiale<br>2-3 jours   | Après 2-3 jours d'accumulation du biofilm, une réaction inflammatoire se développe. Elle est caractérisée par la migration et le développement de neutrophiles (PN) et de macrophages (Mo). Une réponse immunitaire non spécifique se met en place.<br><br>Cliniquement, la gencive apparaît saine malgré le développement de cette réponse cellulaire.  | GINGIVITE   |
| Lésion précoce<br>1 semaine    | Après une semaine d'accumulation de biofilm, la lésion progresse vers un niveau plus important d'inflammation. L'infiltrat inflammatoire se modifie et est dominé par les LT et les PN, signifiant la mise en place d'une réponse immunitaire plus spécifique. L'épithélium se modifie : proliférations de projections épithéliales dans le tissu conjonctif et perte de la partie coronaire. Une prolifération vasculaire est également observée. |             |
| Lésion établie<br>14- 21 jours | Au bout de 14-21 jours, la composition cellulaire évolue vers une population plasmocytaire majeure (10 à 30 %) et la présence de nombreux IgG extravasculaire. Les projections épithéliales se distribuent dans le tissu conjonctif et l'épithélium sulculaire devient un épithélium de poche (fausse poche !), complètement perméable aux échanges cellulaires et moléculaires bidirectionnels.   |             |
| Lésion avancée                 | Le biofilm est très étendu le long de la surface radiculaire et dans la poche. Les plasmocytes sont devenus majoritaires. Une perte de tissu conjonctif et d'os alvéolaire est constatée. Cliniquement, une perte d'attache est constatée.   | PARODONTITE |

***Tableau 2 - Pathogénie de l'inflammation chronique dans la maladie parodontale [32]***

Cette classification décrivait une évolution cellulaire séquentielle à la fois de la composition de l'infiltrat inflammatoire et de l'environnement stromal, en présence d'un biofilm, mais également structurale par l'adaptation de l'épithélium (augmentation de la perméabilité) du tissu conjonctif (perte du collagène, changements cytopathologiques des fibroblastes) et du tissu osseux (résorption osseuse). Ainsi, l'évolution naturelle de la maladie était présentée comme le passage d'une composition cellulaire dominée par les PN, dans la lésion initiale, à une composition cellulaire plasmocytaire prédominante, dans la lésion avancée. La présence bactérienne était présentée comme étant essentielle pour l'induction de

la réponse inflammatoire, mais le passage d'une lésion établie à une lésion avancée n'était pas systématique, et dépendait de la réponse de l'hôte.

Kornman et al. en 1997 [96] reprirent ce concept et présentèrent la mise en place d'une parodontite en quatre scènes incluant les évolutions histologiques et cellulaires en réponse au biofilm (Tableau 3). Ils suggérèrent que le passage d'une scène à l'autre n'était pas inévitable, et que les productions bactériennes, les facteurs intrinsèques et extrinsèques modifient la réponse individuelle de l'hôte face au défi bactérien.



|   |  |
|---|--|
| <p><b>Scène 1 :</b><br/><b>Défi bactérien aigu :</b><br/><b>l'épithélium et la</b><br/><b>vasculaire répondent au</b><br/><b>défi bactérien</b></p>   | <p>Différents facteurs de virulence bactériens (LPS des Gram-) et des constituants de l'hôte (acides gras peptide N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP)) activent les cellules épithéliales jonctionnelles. Elles libèrent divers médiateurs inflammatoires, notamment l'IL-8 et l'IL-1<math>\alpha</math>, la PGE2 (prostaglandine E2) et des MMP (Matrix Metalloproteinases) et le TNF-<math>\alpha</math>, mais également des neuropeptides qui influencent la réponse vasculaire locale et activent, associées aux produits bactériens, les mastocytes périvasculaires. Ils libèrent l'histamine et activent les cellules endothéliales vasculaires qui à leur tour sécrètent de l'IL-8 dans les vaisseaux afin de faciliter la migration des neutrophiles.</p> |
| <p><b>Scène 2 :</b><br/><b>Phase de réponse</b><br/><b>inflammatoire aiguë : les</b><br/><b>tissus répondent aux</b><br/><b>signaux précoces</b></p>  | <p>La fuite vasculaire et l'activation du complément commencent à amplifier la réponse inflammatoire locale et à produire une activation cellulaire endothéliale supplémentaire. Des leucocytes et des monocytes supplémentaires sont recrutés et les macrophages (Mo) activés produisent, entre autres, de l'IL-1<math>\beta</math>, 6, 10 et 12, IFN-<math>\gamma</math>, MMP, PGE2 et une série de substances chimiotactiques (MCP, MIP...).</p>  |
| <p><b>Scène 3 :</b><br/><b>Phase de réponse</b><br/><b>immunitaire : activation</b><br/><b>des cellules</b><br/><b>mononucléaires à la</b><br/><b>réponse immunitaire</b><br/><b>locale et systémique</b></p>                       | <p>Peu de temps après le début de l'inflammation, l'exsudat vasculaire devient prédominé par les cellules mononucléées (L, LT), en plus de l'activation des Mo et des protéines sériques. Les plasmocytes sont prédominants et produisent des IgG, IL-6 et TNF-<math>\alpha</math>. Les LT activées produisent des cytokines (IL-2, 3, 4, 5, 6, 10 et 13) et TNF-<math>\alpha</math>, TGF-<math>\beta</math>, IFN-<math>\gamma</math>, CCL2/MCP, CCL3/MIP. Certains PN sont activés dans le tissu et produisent IL-1<math>\alpha</math>, 1<math>\beta</math>, 6, 8, TNF-<math>\alpha</math>, les leucotriènes (LT) et MMP. Les fibroblastes produisent du collagène, des MMPs et des TIMP (inhibiteurs des MMP).</p>   |
| <p><b>Scène 4 :</b><br/><b>Phase de régulation et de</b><br/><b>résolution : déterminants</b><br/><b>des composants</b><br/><b>protecteurs dans</b><br/><b>l'équilibre du sulcus et du</b><br/><b>collagène dans les tissus</b></p> | <p>La charge du médiateur inflammatoire dans le tissu augmente et comprend les contributions par les fibroblastes d'IL-1, IL-6, IL-8, PGE2, ainsi que du collagène, MMP et TIMP. Les cellules plasmatiques sont proéminentes.</p>  |

***Tableau 3 - Réponse de l'hôte au défi bactérien dans la parodontite [96]***

Dernièrement, Hajishengallis et al. [3] ont revisité le concept de Page et Schroeder en y ajoutant 40 ans d'évolution des connaissances microbiologiques et immunologiques en parodontologie. Les différentes cellules immunitaires se répartissent au sein de la gencive afin d'assurer leur fonction et permettre l'organisation des mécanismes de défense. Tous les processus en place de la lésion initiale à la lésion avancée sont extrêmement régulés et complexes, que ce soit au niveau de l'immunité innée ou au niveau de l'immunité adaptative, et en perpétuelles interactions. Le biofilm dysbiotique entraîne une dysrégulation des mécanismes immunitaires qui vont à leur tour déséquilibrer les mécanismes de la balance

osseuse. L'ostéoimmunologie est une discipline née de l'étude des interactions entre le métabolisme osseux et la réponse immunitaire [138]. À travers une présentation des mécanismes en jeu, nous parlerons dans un premier temps les différentes cellules du système immunitaire entrant dans ces processus. L'organisation de ces différents types cellulaires, notamment des LB, a été étudiée sur des coupes histologiques de gencive de différentes situations pathologiques ; nous présenterons l'évolution des connaissances sur le sujet.

Nous nous attarderons en détail sur le LB et son rôle dans les maladies parodontales dans un chapitre qui lui sera entièrement consacré (Chapitre III).

## **5- Ostéoimmunologie : importance de l'axe RANKL/RANK/OPG dans la perte osseuse et le système immunitaire**

L'ostéoimmunologie est un concept récent mis en avant par les travaux de Aaron et Choi dans les années 2000 sur l'interface immunosquelettique [3, 138-140]. Ils se sont concentrés sur la compréhension moléculaire des interactions croisées entre le métabolisme osseux et le système immunitaire qui aboutissent dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques à une perte osseuse liée aux mécanismes inflammatoires.

Le facteur essentiel est la triade RANK-RANKL-OPG qui est commune aux deux métabolismes [141, 142]. La croissance des organes lymphoïdes, notamment les communications entre les LT<sub>i</sub> (lymphoid tissue inducteur – RANKL<sup>+</sup>, LT $\alpha_1\beta_2$ <sup>+</sup>, IL-7R<sup>+</sup>, RANK), cellules de la lignée hématopoïétique, et les LT<sub>o</sub> (Lymphoid tissue organizer, RANK<sup>+</sup>, RANKL<sup>+</sup>), cellules de la lignée mésenchymateuse passe en partie par RANKL qui induit une croissance de l'organe et une boucle d'amplification qui aboutit à l'accumulation des LT<sub>i</sub> [143, 144]. La triade RANK-RANK-OPG n'est donc pas un facteur important uniquement dans le métabolisme osseux, mais également pour l'organisation de la réponse immunitaire [145]. De même, les communications entre les ostéoblastes (OB), les PO et les cellules du mésenchyme passent par la triade RANK-RANKL-OPG [146].

La plupart des cellules immunitaires expriment RANKL ou induisent la différenciation des PO en ostéoclastes (OC), notamment les LB et les LT qui sont les principales sources de RANKL dans les processus parodontaux [147].

### **a- Le métabolisme osseux**

L'os est un organe dynamique qui est en perpétuel remodelage, tout au long de la vie de l'individu. Les phases de destruction et de remodelage se déroulent en parallèle et sont

en équilibre afin de maintenir l'homéostasie et une adaptation fine de l'os à son environnement.

Trois types cellulaires communiquent constamment entre eux pour assurer le métabolisme osseux : les OB ( $RANKL^+$ ,  $RANK^+$ ,  $OPG^+$ ) qui synthétisent les protéines collagéniques et non collagéniques de la matrice osseuse (matrice ostéoïde), qui sera minéralisée dans un second temps, les ostéocytes, cellules en réseau connecté permettant de renseigner les OB des contraintes supportées par l'os, et les OC, d'origine hématopoïétique, et responsables de la dégradation de la matrice osseuse [148].

Le remodelage osseux suit plusieurs phases cycliques (activation, résorption, inversion, formation), influencées par RANKL. Ces différentes phases sont liées à divers facteurs physiologiques comme l'âge, le statut hormonal, les infections, le régime alimentaire et les processus auto-immuns.

## **b- La triade RANK-RANKL-OPG**

RANKL le facteur essentiel du remodelage osseux qui fait partie de la superfamille des TNF (aussi appelé TRANCE, TNF Related Activation-induced Cytokine). Il régule le développement, la maintenance et l'activation des ostéoclastes et les caractéristiques morphologiques du tissu osseux [146, 149]. RANKL interagit avec 2 récepteurs : RANK (TRANCE Receptor) qui est un récepteur membranaire, parfois soluble et OPG (ostéoprotégérine), toujours soluble [150]. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) est par ailleurs un agoniste soluble de RANKL, qui se lie également à OPG. [145, 151].

RANKL peut être présent sous 3 formes moléculaires ou isoformes différentes, suite à l'épissage alternatif d'un même gène [150, 152]. Il s'agit :

- d'une protéine transmembranaire de type II : hRANKL1
- d'une forme sécrétée primaire : hRANKL2
- d'un ectodomaine tronqué ou forme clivée : hRANKL3

Les formes solubles contrôlent l'ostéoclastogénèse et la forme transmembranaire régule la biodisponibilité de l'OPG (Kwan Tat et al. 2006). Le clivage de hRANKL1 peut être assuré par des protéases comme les MMP (Matrix Metalloproteinases) (MMP-7, MMP-14), les ADAM (10 et 17), mais également par TACE (TNF- $\alpha$  Converting Enzyme) [153-155]. TACE est synthétisé par les cellules mononucléaires gingivales (CMG) pour initialement favoriser la synthèse du TNF- $\alpha$ . RANKL est particulièrement présent sur les OB, les lymphocytes, les cellules stromales et les cellules endothéliales [145].

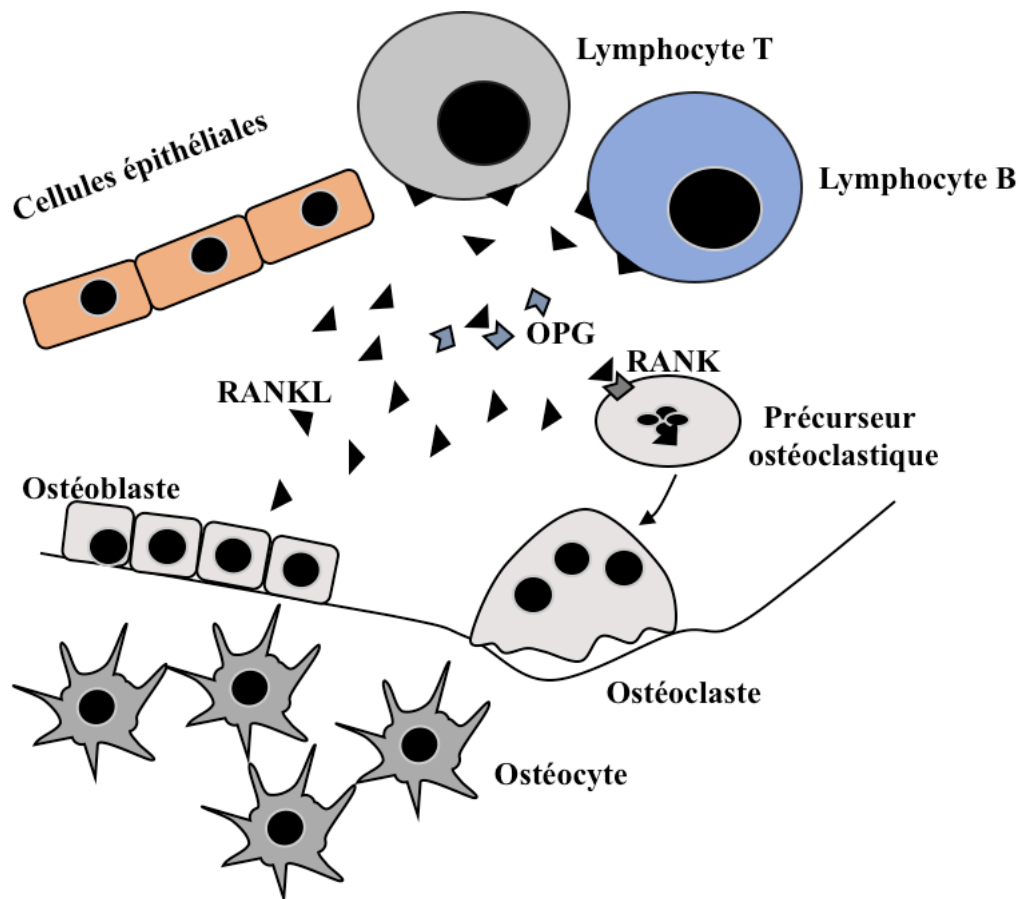
Dans les parodontites, les deux isoformes sont détectées sur les lymphocytes, mais il semblerait que la forme soluble soit principalement produite suite au clivage de hRANKL1 par TACE, et qu'elle est prédominante dans l'engagement de la voie ostéoclastique [147, 155]. En effet, l'expression membranaire est faible sur les plasmocytes alors que l'expression intracytoplasmique de RANKL est importante [156]. De même, les LB mémoires RANKL<sup>+</sup> ont un rôle important dans les PR [157].

RANK est un récepteur qui appartient à la superfamille du TNF et qui a une homologie importante avec CD40. Il existe une forme soluble dont le rôle est encore inconnu [158] et qui est présente sur différents types cellulaires, notamment, les PO, les OC matures, les lymphocytes, les cellules dendritiques (DCs), les cellules endothéliales et certains fibroblastes [145]. L'expression de RANK peut être stimulée par des facteurs exogènes comme l'IL-1 ou la vitamine D3 [159].

L'OPG ou un récepteur soluble qui appartient à la superfamille des TNF dont le principal ligand est RANKL, mais aussi TRAIL. Il permet d'inhiber RANKL et a un rôle majeur dans la balance osseuse [145]. Sa fixation à TRAIL bloque l'activité pro-apoptotique de TRAIL et OPG représente un facteur de survie des cellules endothéliales [160, 161]. OPG est sécrété par de nombreux types cellulaires, notamment les cellules stromales de la moelle osseuse, les LB et les cellules dendritiques. La sécrétion d'OPG par les LB et les cellules dendritiques peut être induite par TNF- $\alpha$ , RANKL, l'IL-1 $\beta$  et après activation par le CD40L [162, 163]

Ainsi dans les parodontites, le taux de RANKL est élevé et le taux d'OPG reste bas et similaire à celui des patients sains [164, 165]. La surexpression de RANK dans les tissus épithéliaux de la gencive stimule la prolifération, bloque la différenciation des cellules épithéliales, et participe à l'inflammation épithéliale et la formation de la poche parodontale [165].

Les rôles multiples de RANKL, à la fois sur le métabolisme osseux et l'organisation du système immunitaire, mais aussi émergeant sur les épithéliums nous a poussé à l'intégrer à notre étude sur le phénotype des LB en parodontologie.



**Figure 1 : Triade RANK-RANKL-OPG dans le métabolisme osseux et le système immunitaire**

## **c- Les cellules immunitaires**

### *c.1- Les polynucléaires neutrophiles (PN)*

Les PN sont les premiers acteurs de la réponse immunitaire innée, dont la fonction principale est la phagocytose des éléments reconnus comme étrangers. Dans la gencive saine, des gradients coordonnés de chémokines et de molécules d'adhésion fournissent des signaux chimiotactiques et haptotactiques pour la migration dirigée des PN vers le sulcus gingival, au plus proche des éléments du biofilm. Leur régulation et leur recrutement coordonné sont vitaux pour l'homéostasie tissulaire parodontale. Ainsi, un déficit fonctionnel ou numérique chronique en PN est à l'origine d'une susceptibilité individuelle accrue aux parodontites, comme dans les neutropénies, le syndrome de Kostman ou le syndrome de Chediak Higashi [166, 167].

Les PN sont les acteurs principaux de la lésion initiale [32] ; une augmentation de PN passant dans le sulcus à travers l'épithélium est observée lors de cette phase inflammatoire aiguë. Lorsqu'un biofilm dysbiotique ne peut être contrôlé, les PN sont dysrégulés ; ils induisent une hyperinflammation et participent aux destructions tissulaires parodontales. En effet, sous différentes stimulations (LPS bactériens, complément, environnement

cytokinique), les capacités de phagocytose des PN sont bloquées et ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, (IL-23 et IL-17), ou pro-LB (APRIL - A proliferation-inducing ligand -), expriment et libèrent du RANKL suite à l'interaction combinée du TLR4 et du complément, des ROS (Radicaux libres Oxygénés), et des MMPs, mais également des cytokines immunorégulatrices (IL-10, TGF- $\beta$ ) [121, 168-172].

Les PN présentent alors un phénotype hyperinflammatoire qui persiste après traitement parodontal, soulignant une origine génétique ou des effets épigénétiques de longue durée [3, 173]. Les PN ont un rôle majeur dans l'homéostasie parodontale et leur absence ou leur présence en grand nombre [174], mais également leur hyperactivité ou leur hyperréactivité, et l'augmentation de leur durée de vie [3], peut potentiellement contribuer à l'établissement d'une parodontite. Le maintien de l'homéostasie tissulaire nécessite la présence d'une numération normale [3].

Les PN régulent l'immunité adaptative : ils sont capables de migrer vers les LN (Ganglions lymphatiques ou Lymphonoeuds) et d'interagir avec les DCs pour moduler la présentation d'antigène [175]. De plus, la sécrétion d'IL-23 permet le recrutement des LTh17 sur les sites d'infection ou d'inflammation [176] et la synthèse d'APRIL (A proliferation-inducing ligand), permet la survie, la prolifération et la différenciation des LB en plasmocytes [177, 178]. Ils acquièrent une polyvalence fonctionnelle (polarisation N1 et N2 aux fonctionnalités différentes, comme les Mo), et régulent les autres leucocytes, notamment les lymphocytes [172].

### *c.2- Les macrophages (Mo)*

Les macrophages (Mo, CD68b<sup>+</sup>) sont des cellules de l'immunité innée dérivant exclusivement de la lignée monocyttaire. Ils présentent des propriétés de phagocytose, mais également, comme les DCs dont ils sont phénotypiquement et fonctionnellement proches, des capacités occasionnelles de présentation de l'antigène.

La gencive saine présente peu de Mo, mais leur nombre augmente dans les biopsies tissulaires gingivales effectuées au niveau des sites de parodontite [96, 179], et ils sont généralement associés aux plasmocytes et aux LTh17 [95, 180]. Ils répondent à de nombreuses structures bactériennes, telles que les LPS, des fragments d'ARN ou des lipoprotéines et ils constituent une source importante de molécules pro-inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ , MMPs, PGE2 (prostaglandine E2), IL-23) qui vont influencer la maturation des LB et des LT dans les parodontites [38, 96, 180].

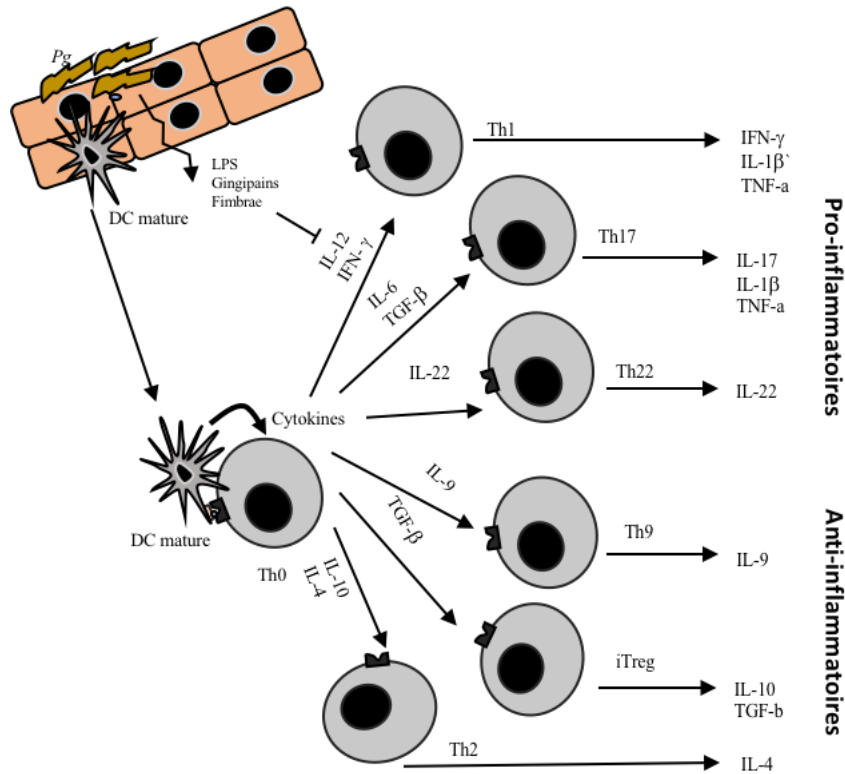
Les Mo présentent une plasticité fonctionnelle importante (activation M1 (CD86<sup>+</sup>) par les agents microbiens ou l'IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma)) et activation M2 (CD206<sup>+</sup>) par les cytokines pro-inflammatoires (IL-4-IL-13)). Ils peuvent donc modifier leurs activités fonctionnelles en réponse au microenvironnement local : les M2 ont des propriétés immunorégulatrices (sécrétion IL-10 et de TGF- $\beta$ ), phagocytent les cellules apoptotiques (efferocytose) et potentialisent la cicatrisation tissulaire. Les M1 présentent une capacité accrue à phagocyter les bactéries et virus et à exprimer des cytokines pro-inflammatoires [181-184]. Les Mo peuvent former des cellules multinucléées ou polykarions, qui peuvent être à l'origine de cellules géantes dans les granulomes inflammatoires chroniques ou des ostéoclastes géants, sous l'induction de RANKL et de MCSF (Macrophage colony-stimulating factor) [138, 185].

Les Mo ont un rôle central dans le maintien de l'homéostasie immunitaire. Les M1 sont majoritaires par rapport aux M2 dans la parodontite et peuvent être profitable au développement des *Pg*, [186].

### *c.3- Les cellules dendritiques (DCs)*

Les cellules dendritiques (DCs) sont les cellules présentatrices de l'Ag. Elles ont une origine hématopoïétique commune avec à la fois la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. Elle dérive d'un progéniteur commun appelé DCP (commun-Dendritic Progenitor, CD34<sup>+</sup>). Les DCs immatures sont également des PO qui peuvent se différencier en ostéoclastes par l'action de RANKL sur RANK, combinée au MCSF. Ce mécanisme peut être modulé par les signaux perçus par les TLR [23, 124, 136, 187-189].

Le principal rôle des DCs est la capture, l'apprêtage et la présentation de l'antigène aux LT naïfs pour initier et réguler la réponse immunitaire adaptative. Cette interaction a lieu principalement dans les LN régionaux, mais peut également se produire dans les tissus périphériques [190-192]. L'action des DCs sur les LT CD4<sup>+</sup> (Th0) va permettre d'orienter leur différenciation vers les LTh1, LTh2, LTh17 ou vers les LTregs [191, 193] en fonction de l'environnement cytokinique et des cytokines pro et anti-inflammatoires secrétées par les DCs [191, 193]. Ainsi en fonction de l'orientation donnée aux LT CD4<sup>+</sup>, les DCs vont avoir des rôles protecteurs ou destructeurs dans les pathologies parodontales (Figure 2).



**Figure 2 : Activation des LT par les DC**

Les DCs sont largement distribuées dans les tissus périphériques et représentent le plus grand groupe de cellules présentatrices d'antigène (CPA). Basé sur leur fonction et leur phénotype, les DCs plasmocytoïdes (pDCs (CD4<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, BDCA2<sup>+</sup>, TLR7<sup>+</sup>, TLR9<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>/ IFNs, IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$ ) sont dérivées des progéniteurs lymphoïdes et spécialisées dans la reconnaissance des Ag viraux et la production des chémokines pro-inflammatoires. Les DCs conventionnelles (cDCs, (CD11b<sup>-/+</sup>, CD11c<sup>hi</sup>, CD1a<sup>+</sup>, CD1c<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD141<sup>+</sup>, CD172a<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>, Clec9a/DNGR1<sup>+</sup>, XCR1<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ , IL-12) sont plus orientées dans la présentation des Ag dans les LN [194-197]. Les cDCs immatures reconnaissant à la fois les bactéries et les virus et patrouillent dans les tissus pour récupérer les Ag étrangers.

Les cellules de Langerhans sont une sous population de DCs spécialisée (CD207+) qui peuple notamment les épithéliums buccaux [192, 198, 199]. Elles ont un rôle de sentinelle et de régulation de la réponse inflammatoire. Leur nombre au sein de l'épithélium est plus élevé dans les atteintes parodontales [200] et elles sembleraient associées à l'induction des LTregs. Leur rôle serait donc protecteur contre l'accroissement de l'inflammation parodontale [201]. Elles déclenchent ainsi et régulent l'immunité adaptative et ont un rôle dans la tolérance périphérique.



Au sein du tissu conjonctif gingival, des DCs interstitielles (iDCs), CD11c<sup>+</sup> et CD11b<sup>+</sup> forment la population majoritaire de la lamina propria et une minorité d'entre elles sont CD103<sup>-</sup>. D'autres cellules de la lamina propria sont CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> et sont appelés Mo-Like. [192].

Les DCs ont un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Lorsque cette homéostasie est perturbée, les phénomènes inflammatoires destructeurs se mettent en place. Leur rôle dans les parodontites est important et l'ablation ou la délétion fonctionnelle des cellules de Langerhans dans un modèle animal montre une augmentation de la susceptibilité parodontale [192, 201-204].

Les DCs, notamment les cDCs, vont être stimulés par les bactéries parodontopathogènes et vont induire une réponse adaptative Th1, Th2 ou Th17. *Pg* induit une réponse Th1 en stimulant la libération d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  [205, 206, 207, 208]. L'IFN- $\gamma$  induit une augmentation de l'expression de RANKL, mais également de RANK et d'OPG par les DCs [159], ce qui peut à la fois favoriser la différenciation ostéoclastique des DCs et la formation de la poche parodontale [165]. Le taux d'IFN- $\gamma$  est généralement haut dans les parodontites et est associé à des lésions sévères et plus évolutives [205]. Une réponse Th17 est aussi induite par *Pg* via la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-23. Les gingipaines clivent l'IL-12 et orientent ainsi la différenciation des LT naïfs vers le phénotype Th17. Cette sécrétion aboutit indirectement à la stimulation de la perte osseuse via l'IL-17, sans que les DCs soient impliquées directement [123, 159, 191, 203, 209]. *Pg* est à l'origine à la fois dans les parodontites d'une différenciation Th1 et Th17 qui peuvent induire dans les deux cas une ostéoclasie via deux mécanismes différents qui semblent entrer en concurrence. Les LPS-*Pg* ou *Tf* induisent une réponse Th2 via le signal TLR [210, 211]. Les LB se différencient en plasmocytes qui eux même produisent également du RANKL et induisent une perte osseuse [156].

Outre l'activation orientée des LT en fonction des cytokines, les DCs promeuvent la survie des LB par la sécrétion de BAFF (B-cell activating factor) et d'APRIL [212, 213] et leur différenciation en plasmocytes par la sécrétion d'IL-6 et d'IFN- $\gamma$  et par contacts cellulaires directs [214, 215]. Les DCs ont aussi des capacités à stimuler les LB naïfs en transférant directement l'Ag et en entraînant une commutation de classe indépendante de la liaison avec les LT [216, 217]. Une infection orale stimule les cDCs qui vont alors migrer

vers les LN régionaux et induire la formation de plasmocytes et la production d'anticorps spécifiques. Lorsque la fonction des DCs est réduite (perte de FoxO1), la production des IgG1 spécifiques et le nombre de plasmocytes diminuent et la perte alvéolaire augmente chez la souris, en comparaison à un contrôle [204]. Les DCs, en activant la production d'anticorps par les LB, participent ainsi au rôle protecteur des LB.

#### *c.4- Les lymphocytes T (LT)*

Les lymphocytes T sont la population lymphocytaire prédominante dans la gencive saine et la lésion initiale décrite par Page et Schroeder [32]. Ce sont des cellules dérivant du même précurseur hématopoïétique que les LB et les DCs, qui suite à une différenciation dans le thymus sont ensemencés dans les tissus lymphoïdes périphériques et dans le pool de lymphocytes en circulation.

Ils forment un véritable réseau cellulaire avec les DCs dans le but de maintenir l'homéostasie tissulaire et la surveillance active du parodonte [218]. Les LT sont principalement situés sous l'épithélium gingival dans la gencive saine et sont principalement des LT CD4<sup>+</sup>, auxiliaires, mais il y a également des LT CD8<sup>+</sup>, cytotoxiques, des LTγδ, quelques cellules lymphoïdes innées (ILC) dont des NK (Natural Killer) et quelques cellules T CD3<sup>+</sup> non conventionnels. L'ensemble de ces cellules aide au maintien de l'homéostasie via des réactions antigéniques spécifiques ou non.

Les LT sont impliqués dans les processus parodontaux : ils restent à ce niveau dans les parodontites, sous l'épithélium de poche. L'infiltrat inflammatoire dans la lésion avancée contient plus de LT que dans la gencive saine, mais les LB, notamment les plasmocytes deviennent prépondérants [179]. Le réseau de DCs et LT orchestre l'immunité. Nous avons vu que les DCs étaient le lien principal entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et qu'il induisait et régulait la différenciation des LT auxiliaires, puis ensuite des LT cytotoxiques et des LB dans les activations T dépendantes.

Les LT ont principalement un rôle protecteur et suppresseur de l'ostéoclastogénèse [219], mais certains phénotypes de LT CD4<sup>+</sup> (Th17, Th1, Th2) peuvent être des inducteurs de l'ostéoclastogénèse durant les processus inflammatoires par l'expression membranaire et la sécrétion de RANKL [138, 147].

Le biofilm dysbiotique, notamment via les mécanismes de subversion du *Pg*, va interagir sur les DCs et orienter la réponse des LT [123, 206, 210, 211]. Ces différentes réactions sont concomitantes et un déséquilibre entre elles peut être responsable d'une perte de l'homéostasie [218, 220]. Une double réciprocité ou paradigme entre Th1/Th2 et entre

Th17/Treg est décrit pour expliquer les processus pathologiques [221]. Le biofilm dysbiotique perturbe cet équilibre et l'oriente vers la promotion de l'inflammation, des destructions tissulaires ou sa résolution.

#### c.4.1 LT effecteurs et LT mémoires

Les LT naïfs ( $CD25^-CD45RA^+CD45RO^-CD62L^+CD27^+$ ) sont des LT n'ayant jamais rencontré l'antigène et qui présente un TCR (T Cell Receptor) variable, suite aux sélections thymiques, pour éliminer les TCR auto-réactifs.

L'interaction des LT naïfs avec les DCs a lieu dans les OLS. Les LT naïfs circulent continuellement via la circulation sanguine entre les OLS et pénètrent dans les organes à travers des cellules endothéliales spécialisées (HEVs, High Endothelial Veinules) via des molécules d'adhésion (LFA-1 ( $CD11a/CD18$ ), L-sélectine ( $CD62L$ ), CCR7). L'expression de CCR7 par les LT naïfs et les DCs matures permet à ces cellules de suivre le gradient de CCL21 et ainsi d'être attirées vers la zone T du LN, et de se rencontrer. Les DCs présentent un peptide antigénique apprêté et associé au CMH (Complexe Majeur d'histocompatibilité) de classe II. Les LT naïfs balayent la surface des DCs présentes et lorsqu'un TCR établit une liaison de haute affinité avec le complexe peptide-CMH-II, le LT est activé et l'expansion clonale peut débuter. Sans liaison de haute affinité, le LT naïf continue de circuler entre les OLS, en suivant les gradients S1P (Sphingosine -1 Phosphate).

Cette interaction avec le TCR est le premier signal permettant l'engagement du TCR et la formation de la synapse immunologique. Le CD4 est associé à la liaison avec le CMH-II et le CD8 à la liaison avec le CMH-I. Une deuxième étape est nécessaire pour poursuivre l'activation spécifique du récepteur à l'antigène des LT. Ce signal de costimulation est indispensable pour protéger les LT d'une anergie ou d'une apoptose précoce et est transmis par les interactions de CD80 (B7), CD86 et CD40 à la surface des DCs avec le CD28 des LT dans un premier temps. L'expression de CD40L ( $CD154$ ) est donc induite et un renforcement du signal CD28 est observé. Les LT activés ou effecteurs ( $CD25^+$ ,  $CD45RA^{+/-}$ ,  $CD45RO^{+/-}$ ,  $CD127^-$ ) prolifèrent sous le contrôle négatif de CTLA4. D'autres facteurs modulent la différenciation fonctionnelle des LT, notamment ICOS (inductible costimulator), important dans l'interaction secondaire des LT  $CD4^+$  avec les LB, ou l'induction de PD-1 (Programme cell Death-1) par PDL-1 ou 2, dans l'orientation des LT vers l'apoptose.

Après activation, l'environnement cytokinique va orienter la polarisation des LT  $CD4^+$  (Th1, Th2, Th17, Th22, Th9, Tregs) et la mise en place d'une réponse humorale (LB) ou cellulaire (LT  $CD8^+$ ). Il existe une plasticité entre les différents profils sous le contrôle de

modifications épigénétiques permettant une adaptation de ces lymphocytes au contexte immunologique.

L'activation des LT CD8<sup>+</sup> passe par la liaison du TCR au peptide apprêté et associé au CMH-I sur les DCs, de la même manière que pour le LT CD4<sup>+</sup>. Ce premier signal a besoin d'un second signal de co-stimulation CD28/CD80 pour éviter l'entrée en anergie du LT CD8<sup>+</sup> et permettre l'expansion clonale des LT. L'environnement cytokinique (IL-2, IL-12, INF $\gamma$ ), déterminé par les LT CD4<sup>+</sup> et les cytokines secrétées par les cellules immunitaires innées (ILCs et DCs) optimise l'activation du LT CD8<sup>+</sup>.

L'activation peut être indépendante du CD4, notamment si CD80 est fortement exprimé par les DCs. La surexpression de CD80 est observée dans un environnement cytokinique riche en IL-2 et en INF- $\gamma$ , et les DCs peuvent activer directement les LT CD8<sup>+</sup>.

L'activation est généralement dépendante des LT CD4<sup>+</sup>. La liaison du LT CD4<sup>+</sup> va activer l'expression de CD80 et donc favoriser l'activation d'un LT CD8<sup>+</sup> naïf.

Les LT CD8<sup>+</sup> activés vont avoir une activité cytotoxique, antivirale et immunorégulatrice en reconnaissant les cellules cibles infectées et présentant le peptide-CMH-I correspondant.

Une population de LT mémoire est formée et plusieurs sous-populations se distinguent [222] [223] :

- une population mémoire centrale qui reste dans les OLS (TCM : CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> et TCM reg : CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>). Ils produisent principalement de l'IL-2, et peuvent se différencier spontanément en cellules produisant de l'IL-4 et de l'INF- $\gamma$
- une population mémoire effectrice qui patrouille dans les tissus (TEM : CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>CCR7<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> et TEM reg : CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>CCR7<sup>-</sup>CTLA-4<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>). Ils sont caractérisés par une fonction effectrice rapide. Certains TEM CD4<sup>+</sup> peuvent être CD62L<sup>hi</sup>.
- une population mémoire souche issue des LT naïfs, plus persistante que les TCM et plus efficace contre les tumeurs (TSCM : CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>)
- une population effectrice mémoire résidente qui reste dans les tissus (rTEM : CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>CCR7<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>)
- une population effectrice mémoire en différenciation terminale (TEMRA : CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>hi/lo</sup>CCR7<sup>-</sup>)

Les LT mémoires vont réagir à la rencontre de l'Ag et devenir effecteurs. Inversement, l'absence de rencontre avec l'Ag va maintenir la population mémoire. Dans la gencive saine, la majorité des LT mémoire  $CD4^+$  et  $CD8^+$  sont des rTEM ( $CD69^+$ ). Il y a peu de LT  $CD4^+$  naïfs et une importante population de LT  $CD8^+_{TEMRA}$  est observée [224].

#### c.4.2 Rôles des lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$ (Th) dans la parodontite

Les lymphocytes T auxiliaires ou helper ( $CD3^+CD4^+$ ) ont un rôle d'intermédiaire dans la réponse immunitaire ; ils n'agissent pas directement sur l'antigène, mais ils vont aider ou réguler d'autres fonctions lymphocytaires ou avoir uniquement des fonctions sécrétoires (Th9, Th22). Ils peuvent ainsi induire une réponse humorale (LB, Th2) ou cellulaire (LT  $CD8^+$ , Th1), ou aider à la formation et au maintien des centres germinatifs (CG) (LTfH, LT follicular helper) [225, 226].

Les LT naïfs vont interagir via leur TCR dans les OLS avec l'Ag présenté par les DCs activés. Des inductions peuvent aussi avoir lieu directement dans les tissus, notamment dans les PR [227]. Ces dernières vont l'apprêter et le présenter accompagné par le CMH-II à leur surface, et activer les LT naïfs. Le CMH-II permet une reconnaissance de l'Ag uniquement par le TCR du LT naïf. En fonction de l'environnement cytokinique, principalement lié aux types de cytokines sécrétés par les DCs, l'activation et la différenciation vont s'orienter vers différents types de LT auxiliaires [225]:

- les LTh1 (IL-12) qui vont activer les LT  $CD8^+$  et les Mo (M1), via la production d'IFN- $\gamma$  dans un but de clairance cellulaire
- les LTh2 (IL-4, IL-10) qui vont activer les LB, les Mo (M2) et les mastocytes et activer l'immunité humorale
- les LTh17 (IL-6, TGF- $\beta$ ) qui vont produire de l'IL-17, du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ ,
- les LTregs (TGF- $\beta$ ) qui vont sécréter de l'IL-10, du TGF- $\beta$  et réguler la réponse immunitaire
- les LTh22 qui sont proches des LTh17 et qui vont produire des peptides antimicrobiens (défencines)
- les LTh9 qui ont une fonction antiparasitaire par la production d'IL9

Des mécanismes de conversions existent entre les différentes sous-populations de LT auxiliaires. En effet, Th17 peut se convertir en Th1 et Treg et ces mécanismes participent à la résolution des mécanismes inflammatoires [228, 229].

#### c.4.2.1 Sous-populations de LT auxiliaires dans les parodontites

##### c.4.2.1.1 Les LTh1

La polarisation en Th1 est induite par l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$ , produites normalement par les DCs et les cellules NK [225]. L'activation d'un TLR par les LPS bactériens sur les DCs immatures peut induire une réponse Th1, comme en présence de *Pg* [206], et induire une activation des Mo (M1) et des LT CD8<sup>+</sup>, et une libération de cytokine pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ). Ce mécanisme est dysrégulé dans les parodontites, suite à la digestion des IL-12 par les gingipaines de *Pg*, favorisant ainsi le phénotype pro-inflammatoire Th17 [123, 230].

##### c.4.2.1.2 Les LTh2

La polarisation en Th2 est induite par l'IL-4. Le LT produit alors des cytokines (IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13) dont la combinaison va induire notamment la prolifération et la commutation de classe des LB activés [231]. Les LPS de *Pg* et *Tf* induisent une réponse Th2 via la signalisation TLR [210, 211].

Il existe par ailleurs une inhibition des LTh1 par les Th2 et réciproquement. Elles sont mutuellement antagonistes : l'IFN- $\gamma$  bloque le développement des LTh2 et l'IL-4 celui des LTh1 [231].

##### c.4.2.1.3 Les LTh17

Le LTh17 représente une substantielle source d'IL-17A et F dans les tissus parodontaux [123, 232], mais il produit aussi de nombreuses autres cytokines (IL-9, 21, 22, 23, 26). Il coopère avec le LTh1 dans l'établissement d'un environnement hyperinflammatoire par l'induction de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  [230], mais aussi interagit, contrairement au LTh1, sur la différenciation du LB en plasmocyte par sa production d'IL-21 et d'IL-17 [232] en plus d'être issu de la différenciation d'un Th0 dans un environnement riche en IL-6, IL-21 et IL-23 [225]. Il favorise le recrutement des PN et peut être impliqué dans de nombreuses maladies auto-immunes et inflammatoires.

L'interaction des LTh17 avec les LB, via notamment l'IL-21 lui donne des fonctions de LTfH-like [232]. Son interaction avec les LB est à l'origine de la formation de CG et la mise en place d'OLT dans certains processus inflammatoires chroniques [232, 233].

Le LTh17 a été mis récemment en avant comme ayant un rôle prépondérant dans la mise en place d'une parodontite [234] et l'infection par *Pg* favorise ce phénotype de LT pro-inflammatoire [123] et la production d'IL-17. L'IL-17A induit la production de RANKL par les ostéoblastes et le LTh 17 est lui-même porteur de RANKL et peut induire une ostéoclastogénèse [235].

#### *c.4.2.1.4 Les LTregs*

Les LTregs sont une population de LT régulateurs caractérisés par l'expression de FoxP3 et la sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$  [236]. Il existe 2 sous-populations de LTreg, les LT régulateurs naturels (nLTreg) produits par le thymus et les LT régulateurs induits (iTreg) ou adaptatif en périphérie. Les LTregs sont très sensibles à l'IL-2 et donc expriment fortement le CD25 (IL-2R).

Les nLTregs inhibent la prolifération des LT effecteurs conventionnels et des LB par contact cellulaire direct [237]. Ils jouent un rôle important dans la régulation de l'auto-immunité. Leur activation dépend de l'environnement cytokinique et de la force du signal TCR reçu, mais également du niveau d'activation des LT effecteurs. Ainsi, les nLTregs ne peuvent pas inhiber la prolifération des LT effecteurs fortement activés ni la production des cytokines pro-inflammatoires [220]. Dans les parodontites chroniques, une importante proportion de nLTregs circulants a été rapportée par rapport au sujet sain [238].

Les iTreg se produisent en périphérie sous l'induction d'IL10 (LTr1, T-regulatory cell 1, sécréteur d'IL-10) et de TGF- $\beta$  (LTh3) à partir de LT naïfs activés. Les LTh3 sont plus particulièrement dans les muqueuses et sont capables de contrôler les réponses immunitaires au contact du biofilm. Récemment, une nouvelle population de iTregs a été décrite, les LTreg activés par les LB (FoxP3<sup>+</sup>ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>T-Bet<sup>+</sup>Bcl6/LAG3<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>CTL4A<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>) [239].

Divers mécanismes suppresseurs sont décrits, comme la capacité de supprimer l'IL-2 par la sécrétion d'IL-10, la réduction de la présentation de l'antigène, l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition de la maturation ou le déclenchement de l'apoptose [220, 221].

Les nLTregs et iTregs, notamment ceux induits par le TGF- $\beta$  (Th3), ont un rôle important dans la régulation des LB : ils suppriment la prolifération et la production d'Ac par les LB et de manière plus importante pour les iTregs [237]. Par ailleurs, les iTregs, et non les nLTregs, ont un effet suppresseur plus important sur les LB produisant des IgM, notamment les LB autoréactifs [237].

Les nLTregs suppriment les LB en les tuant, alors que les iTregs ne provoquent pas leur apoptose. Un contact cellulaire est cependant nécessaire entre les iTregs et les LB, et cette différence d'action peut être liée à des niveaux plus bas de production de granzyme et de perforine par les iTregs [237]. Les iTregs suppriment les réponses LB principalement par la voie de signalisation du récepteur TGF- $\beta$ , au même titre que les LT et les DCs. L'inhibition du LB par l'iLTreg par le TGF- $\beta$  empêche ainsi la différenciation des LB en plasmocytes. Le TGF- $\beta$  induit également une augmentation de la production d'IL-10 par le LB, et un phénotype de LB régulateur (LBreg/LB10). Ainsi, l'iLTreg (Th3) induit la différenciation des LB en LBregs producteurs d'IL-10, qui à leur tour favorisent la différenciation des LT naïfs en LTr1. Les iTregs ne suppriment pas, par contre, les capacités de présentation de l'Ag du LB [237]. Les LTr1 induisent par la suite une expansion des LBreg qui eux même permettent le recrutement des nTregs [240].

Le pourcentage des LTregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CLTA-4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>) est augmenté dans les parodontites par rapport aux gingivites, proportionnellement à l'augmentation des LB [241]. Ils jouent ainsi un rôle régulateur dans les parodontites en bloquant les LB et la prolifération des LTh1, LTh17 et LTh2, mais pas la production de cytokines Th2 [242]. LTh2 et LTregs coopèrent pour supprimer la résorption osseuse inflammatoire, notamment en partageant les mêmes cytokines et chémokines [243]. Les LTregs circulant expriment des taux élevés de CCR4 et CCR5 et ceux dans les tissus parodontaux des taux élevés de CCR4 et CCR8. Ces récepteurs sont responsables de la circulation des LTregs dans le parodonte enflammé. Les LTh2, qui sécrètent entre autres de l'IL-4, expriment dans les tissus gingivaux et le sang CCR3, CCR4 et CCR8, et ces 3 récepteurs participent également à la migration des LTh2 dans les tissus parodontaux. Une altération de CCR4 entrave la migration des LTregs vers les tissus parodontaux et aboutit à une exacerbation de la parodontite, malgré des fonctions immunosuppressives intactes et a une diminution partielle de la réponse Th2. La migration cellulaire passe par les autres récepteurs aux chémokines, notamment le CCR3. Le CCL22 est un des ligands du CCR4, avec le CCL17. L'inhibition de CCL22 inhibe également l'entrée des LTregs. Ainsi, la migration des LTregs dans les tissus parodontaux passe par une interaction CCR4/CCL22. CCL22 est une chemokine Th2 dont l'expression a été induite par les Mo lors de l'expression des cytokines Th2 (IL-4). Les LTregs suppriment les réponses LTh1 et LTh17, mais pas la réponse LTh2. La production d'IL-10 semble influencer les effets protecteurs de l'IL-4 sur l'os (augmentation d'OPG, diminution de l'expression de RANKL) sans induire la production d'IL-4. La migration des LTregs dans les tissus parodontaux suit donc un axe IL-4/CCL22/CCR4 [243] et un tel processus atténue le développement des lésions en inhibant la



migration inflammatoire et la production de médiateurs pro-inflammatoires et ostéoclastogéniques. Ainsi, les LTregs jouent un rôle protecteur dans la parodontite, et leur recrutement peut expliquer le passage d'une lésion active à une lésion inactive [244]. Leur perte est par contre responsable de lésions hautement agressives [245].

#### *c.4.2.1.5 Les LTfh*

Les LT follicular helper (LTfh) sont des LT auxiliaires qui se situent en périphérie des follicules B dans les OLS. Ils sont identifiés par leur expression constitutive de CXCR5, récepteur de CXCL13 permettant le recrutement des LB dans le follicule, et de BCL-6 (B cell lymphoma 6).

Certains LT naïfs de la zone T, une fois activés par l'Ag, migrent dans les follicules B et se différencient en LTfh. L'interaction des LB dans les follicules B avec les LTfh est à l'origine de la formation des CG. Elle dépend de la liaison CD40/CD40L et de la sécrétion d'IL-21 et d'IL-4. Les LTfh jouent un rôle majeur dans la sélection et la survie des LB dans les OLS (sélection négative), et notamment sur la différenciation des LB en plasmocytes de haute affinité contre l'Ag.

Il existe plusieurs classes de LTfh et certaines ont des fonctions régulatrices (LTfr, T follicular regulatory cells).

Les LTfh ont un rôle dans certaines maladies auto-immunes comme le lupus ou le syndrome de Gougerot Sjögren, ou ils sont trouvés dans le sang des patients [246]. Dans l'organisation des organes lymphoïdes tertiaires (OLT), les LTh17 acquièrent des caractéristiques effectrices de LTfh, notamment la production d'IL-21 et la capacité à promouvoir la formation d'un OLT et de supporter des réactions CG [233].

#### *c.4.2.1.6 Les LTh22 et les LTh9*

Le LTh22 est proche du LTh17 et est responsable de la sécrétion de peptides antimicrobiens. Dernièrement, il a été rapporté comme induit en réponse au *Aa*, au contraire des LTh9 [247]. Cette polarisation vers le LTh22 pourrait avoir un impact sur le développement d'une parodontite. En effet, l'augmentation du niveau des cytokines Th22, et du nombre de LTh22, sont associés à une augmentation de l'activité ostéoclastiques et à la sévérité de la parodontite [248].

L'IL-22 est une cytokine qui se fixe sur un récepteur membranaire (IL-22R) constitué de l'association de deux sous-unités : IL-22R1 et IL-10R2. Il est exprimé par des cellules non

immunitaires et fait partie de la même famille que l'IL-10. L'IL-22 augmente la production des cytokines et des chémokines de manière dose dépendante, mais n'est pas associée à la production d'IL-17 ou de RANKL [248]. L'IL-22 est une cytokine pro-inflammatoire qui induite de manière indirecte l'ostéoclastogénèse.

A contrario, LTh9 et l'IL-9 sont plus importants chez les patients présentant des gingivites ou présentant des lésions périapicales inactives [247]. Ce phénotype aurait un potentiel rôle d'inhibition de la différenciation des LTh1, LTh17 et LTh22. Ainsi un axe LTh1/LTh17/LTh22 s'opposerait à un axe LTh2/LTregs/LTh9 [247].

#### c.4.2.2 Equilibre LTh1/LTh2 et LTh17/LTReg dans les parodontites.

Créé à la fin des années 1980, le paradigme Th1/Th2 permettait de donner un cadre conceptuel utile pour comprendre l'implication des LT dans les maladies parodontales [3]. Les lésions parodontales stables ressemblent à une lésion d'hypersensibilité retardée et une lésion progressive implique un grand nombre de LB. Ces lésions peuvent être contrôlées respectivement par les cellules Th1 et Th2.

Une forte réponse innée conduit à une réponse Th1 sous l'influence de l'IL-12, l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ , et une faible réponse innée conduit à une réponse Th2 sous l'influence de l'IL-4. Dans une lésion stable, l'IFN- $\gamma$  augmente l'activité phagocytaire à la fois des PN et des Mo et contient donc l'infection. En cas de réponse immunitaire innée inadaptée à l'origine d'une production moindre d'IL-12, une réponse Th1 faible peut ne pas contenir d'infection. La stimulation des mastocytes et la production subséquente d'IL-4 favoriseraient une réponse Th2, une activation des LB et une production d'anticorps. Si ces anticorps ne protègent pas suffisamment la lésion persistera. Or l'activation continue des LB aboutit à des destructions tissulaires [211, 221].

Comme dans les cas du paradigme Th1/Th2, les mécanismes de contre-balancement avec l'environnement cytokinique local contribuent aux réponses Th17/Tregs. Les LT CD4 activées expriment à la fois ROR $\gamma$ t et Foxp3, mais la fonction ROR $\gamma$ t est antagoniste de Foxp3. En présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et de faibles concentrations de TGF $\beta$ , ROR $\gamma$ t est non régulée et l'expression de Foxp3 est inhibée, favorisant le phénotype Th17. En l'absence de ces cytokines pro-inflammatoires, une forte concentration de TGF $\beta$  favorise l'expression de Foxp3 et conduit à la différenciation en LTregs.

La balance LTh17/LTregs pourrait être ainsi associée à la progression d'une parodontite et à la destruction tissulaire pathologique, mais également influencer l'évolution

de certaines maladies systémiques associées aux parodontites : une inflammation locale est à l'origine d'une augmentation du ratio LTh17/LTregs dans le sang [236].

Les bactéries parodontopathogènes influencent ces ratios. Ainsi Th3 et Th1 sont particulièrement augmentés au contact de *Fn* alors *Td* induit uniquement une réponse Th1 dans les parodontites chroniques [249].

Les deux paradigmes se combinent, mais le concept ne prend pas en compte les potentiels rôles des autres sous populations de LT CD4<sup>+</sup> activés, notamment LTh9 et LTh22 discutés plus haut.

Une dichotomie claire persiste entre les profils d'expression cytokinique associés à ces populations lymphocytaires. Une direction dans l'expression de chacune va orienter une lésion vers l'activité ou l'inactivité [250].

#### c.4.3 Rôles des lymphocytes T cytotoxiques dans les parodontites.

L'activation des LT CD8<sup>+</sup> est dépendante de la réponse Th1 et cette population est hétérogène. Son rôle dans la mise en place d'une parodontite n'est pas clair et peu d'études ont cherché son rôle exact, notamment sous sa forme activée [251]. Dans les années 1990, avant de connaître l'axe RANKL-RANK-OPG, la réponse Th1 était associée aux destructions parodontales et le LT CD8<sup>+</sup> pouvait être destructeur via la production d'IFN- $\gamma$  et la stimulation de la sécrétion d'IL-1 par le Mo, aboutissant à la destruction osseuse [252].

La plupart des études ont montré que les LT CD8<sup>+</sup> n'étaient pas impliqués dans les maladies parodontales, bien qu'ils soient en plus grand nombres dans les parodontites et les gingivites [253-255]. Outre des fonctions dans la suppression, la cytotoxicité et la réparation tissulaire, un rôle dans la régénération osseuse, des fonctions régulatrices ont été récemment mis en évidence [138, 255, 256].

L'activation via le TCR des LT CD8<sup>+</sup> naïfs par les OC permet l'expression de FoxP3, CD25, CTLA-4, RANKL et CD122 [255, 257]. Les LT CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> induits par les OCs sont capables de supprimer la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> naïfs par les DCs et ont ainsi une activité potentielle de LTregs. Les LTregs CD8<sup>+</sup> (Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>RANKL<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>) expriment des cytokines (IFN- $\gamma$ , CTLA-4, IL-6) qui suppriment directement la formation et l'activité des OC, sans affecter leur survie, en supprimant la formation de l'anneau d'actine [258]. Paradoxalement, l'IL-6 et RANKL sont des inducteurs respectivement indirects et directs de l'activité ostéoclastique, mais ces effets sont contrebalancés par l'inhibition produite par l'IFN- $\gamma$  et CTLA-4 [256]. De plus, les LT CD8<sup>+</sup> secrètent Wnt10b, une cytokine promouvant l'ostéoblastogénèse, et les LT CD8<sup>+</sup> pourraient par des mécanismes non encore élucidés

promouvoir la régénération osseuse [255, 259]. Ces actions sont indépendantes de l'état inflammatoire, ce qui suggère que les LTregs CD8<sup>+</sup> ont un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie osseuse [138, 256].

La plupart des LT CD8<sup>+</sup> dans les tissus gingivaux sains sont des LT mémoires effecteurs (TEMRA) [224], et il semblerait que cette population de LT CD8<sup>+</sup> jouerait un rôle clé dans la préservation de l'intégrité tissulaire. Ces LT CD8<sup>+</sup>TEM expriment l'IL-10 et le TGF-β et ont ainsi des fonctions protectrices vis-à-vis du tissu osseux [255]. Ce rôle pourrait être masqué par l'ensemble des réponses immunitaires face au biofilm dysbiotique [255]. L'activation des LT CD8<sup>+</sup> gingivaux est principalement transmise par des signaux indépendants du TCR, via des récepteurs innés aboutissant à la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β [255, 260]. Le biofilm non dysbiotique, dans des conditions physiologiques, pourrait avoir ainsi un rôle dans l'homéostasie osseuse [255].

Au niveau sanguin, en 2015, Cifcibasi et al. montrèrent une augmentation des LT CD8<sup>+</sup> activés dans le sang des patients atteints de parodontite, notamment dans les parodontites agressives, par rapport aux patients sains. [251]. Une observation similaire a été rapportée sur des coupes de gencives analysées en immunohistochimie, notamment dans les parodontites agressives [261]. Le rôle des LT CD8<sup>+</sup> dans les parodontites n'est pas encore complètement élucidé, mais l'observation d'une augmentation dans le sang des patients des LT CD8<sup>+</sup>, comme les nLTregs, sous-entend que les maladies parodontales ont un impact sur la réponse inflammatoire systémique.

#### c.4.4 Rôles des cellules lymphoïdes innées (ILC) dans les parodontites

Les cellules lymphoïdes innées constituent une famille de cellules immunitaires innées qui jouent un rôle dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires et dans le remodelage tissulaire [262]. Trois groupes de cellules lymphoïdes sont définis :

- Les ILC1, qui sont caractérisées par la production de IFN-γ et leur incapacité à produire les cytokines Th2 et Th17. Les NK font partie de ce groupe.
- Les ILC2, qui sont IL-7 dépendantes pour leur développement et qui produisent des cytokines associées aux LTh2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), en réponse à l'IL-25, l'IL-33 et TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) (IL-7-like Protein). Ils modulent ainsi la différenciation des LB en cellules sécrétrices d'Ac.
- Les ILC3, qui se définissent par leurs capacités à produire l'IL-17A et l'IL-22. Elles se rapprochent des LTh17 également au niveau de leur développement et possèdent

ROR- $\gamma$ T, comme facteur de transcription. Elles comprennent les LT $\gamma\delta$ , encore appelés LT non conventionnels.

Tous les types d'ILCs augmentent dans les parodontites chez la souris, notamment les ILC2 et 3 [262]. Cette augmentation est notamment associée à une augmentation des cytokines ILC2 (IL-33, IL-5, IL-15), donc des cytokines Th2, mais les ILC3 prédominent. Les ILC3 jouent un rôle double en fonction du profil cytokinique : protecteur (IL-22) et destructeur (IL-17, IFN- $\gamma$ ) [262]. Les ILC3 comprennent les cellules inductrices des tissus lymphoïdes (LTi), miroirs de l'expression cytokinique des LTh17 et ont un rôle majeur dans la régulation des OLT, dans les inflammations chroniques [233]. Les ILC1 prédominent par contre dans la gencive saine [224].

Aucune étude n'a été effectuée sur le rôle spécifique des différentes populations d'ILC2 dans les parodontites, or, ils semblent avoir un rôle important dans la réponse Th2 [262] et l'activation des LB. Parmi les ILC1 et 3, les Natural Killer et LT $\gamma\delta$  ont suscité plus d'intérêt.

#### c.4.4.1 Les Natural Killer (NK) dans les parodontites

Les NK sont principalement impliqués dans l'élimination des cellules infectées par un virus, transformées ou aberrantes. Ils produisent de nombreuses cytokines (IFN- $\gamma$ ) et des facteurs de croissance qui vont moduler les réponses immunitaires des LB et des LT. L'activation et la maturation des NK favorisent le développement, la maturation et l'activité des OC. Ils expriment également MCSF et RANKL et sont donc capables d'induire une ostéoclastogénèse [138].

Les TCR des NK est quasi invariant (chaîne  $\alpha$  invariable et chaîne  $\beta$  variable) et ils forment une population hétérogène de LT qui peuvent être impliqués dans des pathologies auto-immunes. [263]. Ils orchestrent les maladies inflammatoires chroniques et peuvent être à l'origine d'effets protecteurs et délétères [263].

Les NK jouent un rôle important dans la mise en place d'une parodontite, notamment via leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui induit une réponse Th1, et de TNF- $\alpha$ , mais les mécanismes mis en place restent peu connus [252, 264 ].

#### *c.4.4.2 Les lymphocytes $T\gamma\delta$ ( $LT\gamma\delta$ )*

Les  $LT\gamma\delta$  forment une population hétérogène de lymphocytes non conventionnels qui participent à la fois à l'immunité innée et adaptative. Ils diffèrent des LT conventionnels par la structure de leur TCR ( $TCR\gamma\delta$ ). Ils n'ont pas besoin du CMH pour reconnaître l'Ag et identifient des épitopes conservés au sein des pathogènes. Une fois activés, ils se multiplient en présence d'IL-2 et peuvent également former des populations mémoires. Ils possèdent des TLR qui leur permettent de réagir aux LPS bactériens, ont des fonctions cytotoxiques (perforine, granzyme) des capacités de phagocytose pour certains ( $V\gamma 9/V\delta 2$  T) et expriment de nombreuses cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-22, IL-21 TRAIL, FASL...) et des facteurs de croissance (FGF), suivant les sous-populations et leur activation, qui leur permettent de moduler les réponses immunitaires et contrôler la croissance épithéliale [265].

Ils sont principalement localisés dans les épithéliums [266, 267]. Ils participent avec les DCs et les PN la première barrière de défense anti-infectieuse. Ils sont peu représentés dans la gencive [224]. Leur rôle n'est pas complètement compris, notamment dans les parodontites où il a été peu étudié [265, 266, 268, 269]. Certains  $LT\gamma\delta$  sont circulants et une distribution sanguine anormale de ces cellules a été rapportée chez les patients avec une maladie parodontale [268]. Au sein des tissus, ils collaborent étroitement avec les LT conventionnels [267].

Il semblerait par ailleurs qu'ils soient une source prédominante d'IL-17 dans certaines arthrites (CIA, collagen induced arthritis), à l'instar des  $LTh17$ , mais leur rôle reste méconnu dans la régulation de l'ostéoclastogénèse ou dans le développement des OLT [233, 270, 271].

#### *c.5- Les lymphocytes (LB)*

Page & Schroeder en 1976 décrivaient les LB comme la population lymphocytaire prépondérante, notamment dans les lésions avancées, face au défi bactérien. Ce type cellulaire orchestre la réponse immunitaire adaptative et interagit constamment avec les LT [272]. Deux populations avec une ontogenèse distincte sont décrites : les LB1, indépendants d'une maturation dans les OLS et les LB2 (maturation dans les OLS). Chacune de ces populations de LB peut être à l'origine des plasmocytes rencontrés en masse dans la lésion avancée, donc de la sécrétion d'Ac après différenciation en plasmocytes.

Plusieurs sous-populations de LB1 et LB2 sont décrites et sont associées au degré de maturation tissulaire et aux fonctions qui les caractérisent. Les deux populations de LB peuvent avoir, en plus des fonctions sécrétrices d'Ac, des fonctions de présentation de l'Ag,

des fonctions de sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires, mais également des fonctions régulatrices. Par ailleurs, les LB1, qui ont un rôle dans l'immunité innée, ont des capacités de phagocytose [273, 274], et de se différencier en ostéoclastes [275], et sont considérés par certains auteurs comme des LB immatures, lorsqu'ils sont CD5<sup>+</sup>, ayant un rôle dans les maladies auto-immunes [276].

Les LB et plasmocytes expriment mRANKL, sRANKL et OPG, mais de manière moins évidente RANK à leur surface [271, 277, 278]. Ils régulent donc l'ostéoclastogénèse directement via l'expression de RANKL et d'OPG, du DcR3 (Decoy Receptor 3), mais aussi indirectement via la sécrétion d'IL-7, qui est un stimulateur potentiel de la résorption osseuse [271].

La dysbiose peut être à l'origine d'une dysrégulation du LB, notamment par tous les effets sur les cytokines (Chapitre II.3) qui modifient l'environnement cytokinique, et donc les voies de différenciation du LB et les actions des LPS sur les TLR qui ont un rôle primordial dans le développement et la différenciation des LB [279].

## **6- Organisation du réseau cellulaire immunitaire au sein des tissus parodontaux**

La muqueuse orale agit comme une barrière organisée et est un élément majeur de la protection de l'organisme face au défi bactérien. L'interface gingivale est en constante interaction avec le biofilm et est le lieu de mécanismes immuns permettant le maintien de l'homéostasie.

Plusieurs études histologiques ont décrit l'organisation des cellules immunitaires au sein des tissus parodontaux et leur composition et leur localisation par rapport à *Pg*. [32, 46, 95, 96, 156, 179, 224, 280-282]. Page et Shroeder avait déjà repris des études antérieures pour décrire leur modèle étiopathogénique [32].

Dans les années 1980, plusieurs études confirmèrent la prédominance des plasmocytes et leur fonctionnalité [283-285]. En 1979, Seymour et al. [95] montrèrent que les PN étaient au contact du biofilm et que des lymphocytes étaient immédiatement sous-jacents à l'épithélium, plus précisément des lymphocytes de type plasmocytes et à l'origine d'une sécrétion d'Ac majoritairement IgG. Ils émirent également l'hypothèse que la parodontite était caractérisée par la conversion d'une lésion T stable vers une lésion B [31].

Les aspects histologiques ne permettaient pas de distinguer les différents types de parodontites [286] et le degré de destruction parodontale était corrélé à la proportion de plasmocytes dans la population lymphocytaire [287, 288]. Le ratio LT/LB était plus bas dans les lésions stables que les lésions actives, suggérant ainsi une régulation anormale des LB par

les LT [289]. La composition de l'infiltrat cellulaire est dépendante du biofilm, mais également de l'environnement cytokinique [290-292].

La composition phénotypique des LB et des LT a mis en évidence la présence de marqueurs d'activation (CD25/IL2-R) sur les deux types cellulaires, notamment les LB [282, 293]. De même, la présence de LB CD5<sup>+</sup> au niveau du conjonctif, sous l'épithélium de poche, est décrite dès 1992 [294-297]. Les LB CD5<sup>+</sup> sont associés à une perte de collagène de structure et une fonction autoréactive, de production d'auto-anticorps anti-collagène [295]. Les infiltrats plasmocytaires sont associés aux Mo, proches des OCs, et le nombre de fibroblastes diminue avec la baisse du collagène [295].

En 2002, Cirincione et al. mirent en évidence la présence de DCs dans l'épithélium (intraépithélial), mais surtout dans la lamina propria au contact des LT. Certaines sont également dans des agrégats de plasmocytes [190].

En 2008, Lins et al. analysèrent par immunohistochimie la densité cellulaire des cellules inflammatoires mononuclées et le nombre des DCs [298]. Ils observèrent une augmentation des plasmocytes et une organisation des LB CD20<sup>+</sup> pouvant être attribuée à une tentative de formation de CG. Les LB et les LT étaient CD25<sup>+</sup> dans les gingivites et les parodontites chroniques. Leur activation était plus intense dans les parodontites chroniques. Le S100 a été utilisé pour déterminer la position des DCs. Comme mis en évidence précédemment, les DCs étaient dans les épithéliums, avec les kératinocytes, mais également dans les tissus conjonctifs, probablement en cours de migration dans les LN. Des résultats similaires furent mis en avant par la suite, avec une augmentation des LB CD20<sup>+</sup> dans les parodontites agressives [261], et une augmentation de l'expression de CD25<sup>+</sup> dans les parodontites sur les LB et LT [299].

Amunulla et al. en 2008 confirmèrent l'augmentation progressive du compartiment des LB au cours de la mise en place d'une gingivite et d'une parodontite, par rapport aux gencives saines [300]. Les LT sont majoritaires dans les tissus sains ; ils augmentent dans les gingivites et parodontites, mais les LB deviennent majoritaires dans les parodontites comme cela a déjà été précédemment décrit [31]. Ils mirent également en évidence une augmentation progressive du ratio LT mémoire/LT naïf au cours de ces différents stades pathologiques. Le ratio plasmocyte/LB était faible dans les tissus sains et les gingivites, ce qui indiquait que quelques cellules se transformaient en plasmocytes, et la proportion de plasmocytes dans les parodontites était très élevée.

En 2008, Nakajima et al. analysèrent l'infiltration des LB (CD19<sup>+</sup>) dans la parodontite et la production de CXCL13 par les cellules dendritiques folliculaires (fDCs), les cellules endothéliales et les fibroblastes gingivaux sur des biopsies gingivales (gingivite vs



parodontite) [281]. À travers cette analyse, ils cherchaient à comprendre quel type cellulaire était responsable du chimiotactisme et du trafic des LB dans la gencive ; le CXCL13 étant essentiel pour ce mécanisme et l'organisation lymphoïde [301]. Ils mirent alors en évidence que l'ARNm de CXCL13 était exprimé dans les deux situations pathologiques. Les cellules CXCL13<sup>+</sup> étaient en plus grande proportion dans la parodontite au niveau du tissu conjonctif sous-jacent à l'épithélium de poche que dans la gingivite, et que ce résultat était corrélé au nombre de LB CD19<sup>+</sup>. Les cellules CXCL13<sup>+</sup> étaient distribuées dans des zones B dominantes et associées ou non avec des fDCs. Ils ne purent conclure sur la présence d'un réseau réticulaire de fDCs, ou d'une formation d'une structure lymphoïde avec un CG actif. Cependant, certaines biopsies de parodontites montrèrent une accumulation de fDCs dans les zones B dominantes. Ils mettent cependant en avant une organisation sous forme d'agrégats cellulaires de LB et LT au sein de la gencive.

En 2012, Guyodo et al. étudièrent en immunofluorescence des biopsies gingivales de patients avec des parodontites pour déterminer le phénotype des cellules immunitaires associées à Pg [280]. Au niveau des coupes, *Pg* est présent dans l'épithélium, et internalisé dans les cellules épithéliales. Ils observent également comme cela est décrit depuis 1976 par Page et Schroeder [32], que les plasmocytes sont prédominants dans les biopsies de parodontites : les LB sont bien différenciés en plasmocytes pour la plupart, et sont probablement associés avec une prédominance de LT Th2. La plupart des *Pg* était en contact direct avec des LT CD4<sup>+</sup>, indiquant que ces cellules ont été recrutées sur le site de l'infection. Les LT CD4<sup>+</sup> forment une zone riche en LT, juste au niveau de la lamina propria, en regard des DCs. La présence de ces agrégats cellulaires LT/LB au sein du tissu conjonctif face à des DCs dans l'épithélium gingival a déjà été décrite en 2001 par Jotwani et al. [200].

Thobert-Mros et al. en 2015 réalisèrent des coupes à partir de biopsies gingivales atteintes de parodontite et de gingivites [179]. Ils les observèrent en immunohistochimie et distinguèrent la localisation des Mo CD68<sup>+</sup>, LT CD3<sup>+</sup>, LB CD20<sup>+</sup>, LB CD20<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (LB1a) et des plasmocytes CD138<sup>+</sup>. Ils conclurent que la densité des LT et LB ne différait pas entre parodontite et gingivite, mais qu'il y avait une large proportion de plasmocytes et de macrophages dans les parodontites, organisés en agrégats cellulaires denses. Dans la gingivite, les LB sont présents sous forme d'agrégat dans le tissu conjonctif et les LT sous la lamina propria, comme décrit précédemment, mais il n'y a pas de zone riche en plasmocytes. Dans la parodontite, par contre, les LT se situent toujours sous la lamina propria et les LB dans le conjonctif. Plus en profondeur, les plasmocytes forment des agrégats en regard d'une zone B CD20<sup>+</sup> et à distance d'une zone T CD3. Au sein des LB CD20<sup>+</sup> se distinguent une proportion de LB CD5<sup>+</sup> plus importante dans la parodontite que dans la gingivite.

En 2016, Mahanonda et al. s'intéressèrent à la composition des infiltrats lymphocytaires B au sein de la gencive cliniquement saine, atteinte de gingivite et de parodontite [156]. Ils analysèrent également la spécificité antigénique de ces LB, leur sécrétion d'Ig et l'expression de RANKL et du granzyme B. La majorité des LB dans la gencive cliniquement saine et la gingivite sont des LB mémoires  $CD19^+CD27^+CD38^-$  alors que, dans la parodontite, la majeure partie des LB présente un phénotype de plasmocytes  $CD19^+CD27^+CD38^+CD138^+HLA-DR^{lo}$ , et non de plasmablastes. Ces derniers semblent avoir été retrouvés plus particulièrement au niveau du sang périphérique des patients étudiés.

Les plasmocytes s'organisent sous forme de clusters ou agrégats qui sont principalement observés à la base de la poche parodontale et également de manière dispersée dans la gencive. Ils s'orientent de l'apex vers le front de la lésion. Les plasmocytes sécrètent principalement des IgG spécifiques aux pathogènes parodontaux et expriment RANKL. L'expression intracellulaire de RANKL est importante comparée à la faible expression de RANKL en surface.

Les LB mémoires résidents sont quant à eux dans le tissu conjonctif sous-jacent à l'épithélium jonctionnel dans la gencive cliniquement saine. Par ailleurs, les auteurs constatent que les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins sont  $PNAd^+$  (Peripheral Node Adresin) et  $ICAM-1^+$  (InterCellular Adhesion Molecule). Ces facteurs sont connus pour permettre la fixation du LB aux cellules endothéliales via respectivement  $LECAM-1$  (Lymphocyte Endothelial Cell Adhesion) et  $LFA-1$  (Lymphocyte Function-associated Antigen) et donc la migration des LB. Ces facteurs peuvent signifier qu'il y a toujours dans la gencive cliniquement saine un fond inflammatoire léger face au défi bactérien. Ils permettent le trafic des LB mémoires qui sont parfaitement fonctionnels et capables après stimulation de sécréter des IgA ou des IgG.

De fortes expressions de CXCL12, APRIL, BAFF, IL-10, IL-6 et IL-21 sont détectées à la fois dans les gingivites et les parodontites. Elles permettent le recrutement, la survie et la différenciation des LB qui accèdent aux tissus parodontaux. IL-21, CXCL12, APRIL, BAFF et IL-10 sont plus particulièrement élevés dans la parodontite, en comparaison à la gencive cliniquement saine. CXCL12 et IL-6 sont par contre surexprimés dans les gingivites par rapport à la gencive cliniquement saine. Aucune différence significative d'expression n'a été démontrée entre gingivite et parodontite.

En 2016, Dutzan et al. caractérisèrent le réseau cellulaire immunitaire situé au niveau de la barrière gingivale chez des patients sains [224]. Ils observèrent une prédominance de LT, peu de LB, une large présence de granulocytes/neutrophiles, un réseau cellulaire de CPA (DCs,

monocytes et macrophages) et une faible population d'ILCs (Innate Lymphoïde cells) contrôlant la gencive.

Les LT dans les gencives saines sont principalement constitués de LT CD4<sup>+</sup>, suivi des LT CD8<sup>+</sup> et d'une faible proportion de LT $\gamma\delta$ . Dix à 15% des LT CD4<sup>+</sup> sont Foxp3<sup>+</sup> donc probablement des LTregs. 80% des LT CD4<sup>+</sup> sont de phénotype mémoire (CD45RO<sup>+</sup>) et les LT CD4<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) sont faiblement présents. Seuls 50% des LT CD8<sup>+</sup> sont de phénotype mémoire ; le reste du compartiment des LT CD8<sup>+</sup> est constitué par une population importante de cellules effectrices en différenciation terminale (TEMRA : CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>) et par une plus petite population naïve. Une majorité des LT CD4<sup>+</sup> mémoire et des LT CD8<sup>+</sup> mémoires dans la gencive sont des LT mémoires résidents (rTEM ; CCR7-CD69<sup>+</sup>), suivi des effecteurs mémoires (TEM ; CCR7-CD69<sup>-</sup>). L'IL-17 est très faiblement exprimée dans le compartiment des LT CD4<sup>+</sup>.

Les ILCs (CD45<sup>+</sup>) constituent une famille de cellules hématopoïétiques mononuclées avec des fonctions clés dans la barrière immunitaire et la réparation tissulaire. Elles représentent 10 à 15% des cellules CD45<sup>+</sup> de la gencive saine. Les ILC1, et 3 sont distinguées en fonction de leurs productions cytokiniques. Dans la gencive saine, les ILCs sont principalement constituées par les ILC1, dont des cellules NK, qui produisent de l'IFN $\gamma$  [263].

Chez les patients atteints de parodontite, une augmentation des PN et une surexpression de l'IL17 est décrite. Dutzan et al. identifient la source principale de la sécrétion d'IL-17 comme étant le compartiment LT CD4<sup>+</sup>, à la fois dans la parodontite que chez le patient sain [224]. L'IL-17 est sécrété par les Th17 qui deviennent majoritaires au sein de ce compartiment T.

Il semblerait ainsi qu'une organisation spécifique de la réponse immunitaire se met en place face au défi bactérien et que de nombreux changements apparaissent dans les populations de cellules immunitaires dans le cadre d'une parodontite. Les PN deviennent plus abondants, et participent à la dysrégulation. Les DCs activent les LT qui sont situés dans une zone T sous-jacente au réseau cellulaire de DCs dans l'épithélium et de monocytes/macrophages. Les LT activés sont principalement des Th17 qui sont très abondants dans la parodontite, et sont sécréteurs, avec les DCs, d'IL-17 qui va aller activer l'ostéoclastogénèse. Une zone B mémoire dans le tissu conjonctif est décrite dans la gencive saine et pathologique, en regard de la zone T. Les LB mémoires ont probablement un rôle dans le maintien de l'homéostasie parodontale [156], au même titre que les LT CD4<sup>+</sup> mémoires [224]. La spécificité antigénique de cette sous-population de LB mémoires et leurs

capacités migratoires sont inconnues et il est difficile de dire si cette population est à l'origine des plasmocytes observés en masse dans la parodontite.

Par ailleurs, une population faible de LB naïf est observée au sein de la gencive [156], quel que soit son état pathologique.

Les plasmocytes expriment RANKL, principalement en intracellulaire, et s'organisent en agrégats cellulaires en profondeur dans le conjonctif, proche du tissu osseux, et participent également à l'activation des ostéoclastes. Il est probable que RANKL soit sécrété par les plasmocytes ou qu'une expression membranaire de RANKL soit rapidement clivée à la surface des plasmocytes par la TNF-alpha-Converting Enzyme  $\alpha$  [155].

### III Le lymphocyte B : acteur majeur des maladies parodontales

Les LB sont des cellules mononuclées, originaires de la moelle osseuse (HSC : Hematopoïétique Stem Cells) après la naissance et présentes dans le sang, les tissus lymphoïdes et les tissus périphériques. Ils sont les principaux médiateurs de la réponse immunitaire adaptative [272]. Leur fonction principale est la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) ou anticorps (Ac) lorsqu'ils sont arrivés au stade de plasmocyte, mais il existe de nombreuses sous-populations aux fonctions et aux phénotypes distincts.

Certaines populations peuvent être autoréactives et s'activer de manière indépendante du LT. Elles sont à l'origine d'auto-anticorps, des immunoglobulines contre des Ag du soi, produites de manière naturelle ou induite.

Elles peuvent aussi avoir des fonctions régulatrices par la sécrétion d'IL-10 (B10 ou B regs), présenter l'Ag aux LT naïfs et les activer, sécréter de nombreuses cytokines pro et anti-inflammatoires en fonction de leur état d'activation, détruire la matrice extracellulaire (MMPs) et moduler la balance osseuse (RANKL, RANK, OPG), voire même des capacités de phagocytose [147, 273, 274, 302-304].

Leur rôle des LB dans les maladies parodontales est clairement démontré [12, 35-37]; la déplétion en LB ou l'altération d'une fonction LB est à l'origine d'une amélioration de l'état parodontal et d'une diminution *in vivo*, chez le rat de la perte osseuse. Les LB apparaissent comme ayant un rôle protecteur et un rôle destructeur dans la pathogénie parodontale [33, 34], notamment via leur participation aux mécanismes auto-immuns dans les parodontites [34, 305, 306] et la destruction osseuse [147, 307].

Deux catégories de LB coexistent avec des fonctions et des voies de maturation différentes : Les LB1 et les LB2. Leurs ontogénèses diffèrent et les LB1 et les LB2 sont respectivement impliqués dans l'immunité innée et adaptative [308, 309]. Les LB de la zone

marginale (ZM) sont considérés par certains auteurs comme des LB non conventionnels, au même titre que les LB1, car ils partagent des caractéristiques communes à la fois aux LB1 et aux LB2 [309]. Les LB-ZM divergent du LB2 plus tardivement que le LB1 ; nous traiterons leur ontogenèse en même temps que celle des LB2, même s'ils sont considérés de plus en plus comme étant une sous-catégorie à part.

## **1- Ontogenèse des LB**

Les LB se développent à partir de précurseurs hématopoïétiques de manière étroitement contrôlée par les réseaux de régulation génique, le remodelage de la chromatine, la signalisation des cytokines et la sélection par l'affinité du récepteur des LB (BCR, C Cell Receptor) [309]. Les différentes catégories de LB (LB1, LB2) apparaissent dans les phases précoces de la lymphopoïèse des LB dans le foie fœtal. Ensuite, une séparation entre les deux lignées cellulaires s'opère et les LB2 se développent dès la naissance dans la moelle osseuse, puis mûrissent dans les OLS.

Chez la souris deux phénotypes de LB1 ont été décrits : les LB1a (CD5<sup>+</sup>) et les LB1b (CD5<sup>-</sup> bien qu'exprimant le transcrit de CD5) [310]. Récemment, cette séparation a été remise en cause chez l'Homme et deux phénotypes ont été décrits : les LB1 CD11b<sup>+</sup> et les LB1 CD11b<sup>-</sup>, classification ne tenant plus compte de l'expression de CD5.

### **a- Ontogenèse des LB1.**

#### *a.1 Développement dans le foie fœtal*

Les LB1 ont été identifiés chez la souris à la fin des années 80 et une grande proportion a été décrite au niveau de la cavité péritonéale [308, 309]. Leur origine a fait l'objet de beaucoup de débats entre les partisans d'un développement à partir de précurseurs hématopoïétiques (HSC) distincts (modèle de lignée) et les partisans d'un changement ontologique dans le développement (modèle de sélection), en réponse à des Ag particuliers [308]. Il semblerait que leur développement suit le modèle du système immunitaire en couche [311], et que les HSC soient distincts : les cellules progénitrices B Lin-CD45R<sup>-/lo</sup>CD19<sup>+</sup> chez la souris donnent préférentiellement des LB1, mais pas des LB2 [312] et le transfert adoptif de HSC issus de la moelle osseuse donne naissance à des LB2, mais jamais à des LB1 [313]. Ces résultats suggèrent que les LB1 n'apparaissent que très tôt dans l'ontogenèse et ne peuvent être générés plus tard dans la vie. L'apparition précoce des cellules B1 est la raison pour

laquelle cette population est désignée «LB1» et les cellules B conventionnelles qui apparaissent plus tard sont appelées «LB2». Une origine commune est toujours possible avec une séparation très précoce des deux lignées [314]. Un modèle à deux voies a été proposé [315, 316] : les LB1 se développent initialement et principalement à partir de précurseurs B1 restreints dans la vie fœtale et subissent une sélection positive en fonction de leur réactivité aux auto-Ag et de la force du signal BCR. Les LB1 sont ensuite maintenus chez l'adulte par un processus d'autorenouvellement, mais des précurseurs des LB1 dans la moelle osseuse adulte peuvent contribuer au pool B1, notamment LB1b [315]. De même, l'expression ectopique de Lin28b (Lin-28 homologue b), un facteur de transcription exprimé dans les HSC fœtales et néo-natales, dans la moelle osseuse, chez l'adulte peut induire la différenciation des HSC en lignées lymphoïdes innées, telles que les LB1a, les LB-ZM, les LB2, les LT $\gamma\delta$  et les LT CD8<sup>+</sup>, qui sont phénotypiquement et fonctionnellement similaires à ceux observés dans la période néonatale [317]. Lin28b dans la lymphopoïèse B joue un rôle important dans la modulation du répertoire aux Ig et du signal BCR. Ce facteur de transcription favoriserait également dans le développement fœtal la génération de LB CD5<sup>+</sup>, en sélectionnant positivement les cellules autoréactives [316, 318].

#### *a.2 Développement dans les tissus périphériques*

Les LB1 immatures migrent du foie fœtal et rejoignent la rate pour leur génération et leur survie durant la vie adulte [319]. Dans la rate, les LB1 et les LB-ZM sont positivement sélectionnés en fonction de l'engagement du BCR pour l'auto-Ag, au contraire des LB2 [309, 319].

Chez la souris, les LB1 vont ensuite principalement peupler le péritoine, la cavité pleurale et la rate, mais quelques LB1 sont parfois trouvés au niveau des LN, dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique [315, 316]. Les LB1 sont rarement observés au niveau des CG [309]. Ils sont décrits dans ce cas dans la zone du manteau, en périphérie du CG [320] et ont la possibilité de migrer dans les OLS à partir des tissus et de se différencier en plasmocytes à courte durée de vie [321].

Une fois dans les tissus, ils sont responsables, suivant leur phénotype, de la sécrétion des Ac-naturels (nIgM préférentiellement, puis nIgA et nIgG3) aux fonctions diverses dans les tissus [322], mais ils peuvent également avoir des fonctions régulatrices [323].

*a.3 Phénotypes et fonctions des LB1*

Les LB1 ont souvent été associés à l'expression de CD5, par analogie au phénotype murin. CD5 sert à atténuer les signaux d'activation du BCR et a longtemps été considéré comme une caractéristique typique des LB1, notamment des LB1a [297], alors que le CD5<sup>+</sup> serait un marqueur typique des LB immatures [276].

Depuis les travaux de Griffin et Rothstein et 2011 [314, 324], sur des cordons ombilicaux et du sang, le phénotype des LB1 chez l'homme est CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD70<sup>-</sup>CD69<sup>-</sup>. CD43 le distingue des populations LB2 mémoire et naïve. CD43 est une leukosialine, une protéine transmembranaire qui a un rôle notamment dans l'activation des LT. Les LB1b n'expriment pas CD5 et disposent donc d'un BCR "non atténué", CD5 étant considéré comme un corécepteur négatif du BCR. Les LB1b peuvent donc être considérés comme des LB1 plus matures. Ils ont un rôle dans le contrôle des infections et ressemblent étroitement aux LB mémoires sur un certain nombre d'aspects. Contrairement aux LB mémoires, le développement des réponses à médiation cellulaire dépendante des LB1b se produit de manière indépendante de l'aide des LT. Le BCR des LB1b est activé par des antigènes indépendants des LT (IT), notamment par des facteurs de virulence relativement conservés, et son activation est à l'origine d'une réponse hautement protectrice [325, 326]. Les LB1b ont par ailleurs la possibilité de se différencier en cellules LB1CDP, (B1 cell derived phagocyte) qui ont des propriétés de phagocytose, peuvent exprimer RANK et se différencier en ostéoclaste-like, sous l'action de RANKL [275, 327, 328]. L'expression de CD11b est un des éléments qui permet ces fonctions.

Les LB1a expriment CD5 et ont donc comme toutes les populations de LB2 immatures un signal BCR atténué. Ils ont un rôle dans le développement pathologique des maladies auto-immunes [326, 329, 330]. Une dysrégulation des fonctions des LB1 a été rapportée pour le développement des arthrites auto-immunes induites par le collagène : les LB1a péritonéaux, chez la souris, subissent une prolifération et migrent dans les tissus articulaires avec une expression de RANKL. Le transfert adoptif de ces LB1 exacerbe la sévérité des arthrites et les dommages articulaires, tandis qu'une déplétion des LB péritonéaux améliore la pathologie [329]. Les LB1a auraient donc une capacité à induire une ostéoclastogénèse et un rôle leur avait été attribué dans les parodontites [33, 294, 295, 297, 331, 332]. Les LB1a ont des capacités importantes de présenter l'Ag [330, 333]; ils peuvent activer des LT autoréactifs et produire des auto-anticorps [330].

Plusieurs fonctions sont donc attribuées aux LB1 : sécrétion d'Ac naturels, principalement des nIgM, stimulation efficace des LT, signalisation intracellulaire chronique, fonction régulatrice par les LB1 CD11b<sup>+</sup> [323].

Deux populations de LB1 (CD5<sup>+</sup> ou CD5<sup>-</sup>) ont été mises en avant selon l'expression du CD11b : la population CD11b<sup>-</sup> est prédominante et la population CD11b<sup>+</sup> minoritaire [314]. Les LB1 CD11b<sup>-</sup> secrètent de manière importante les nIgM et les LB1 CD11b<sup>+</sup> favorisent l'expansion clonale des LT [314], mais également la régule en sécrétant de l'IL-10 [323]. CD11b forme avec le CD18 (β2 intégrine), Mac-1 (Macrophage-A antigen) ou CR3 (complement receptor 3, qui se lie au C3d), une intégrine α<sub>M</sub>β<sub>2</sub>. Cette intégrine α<sub>M</sub>β<sub>2</sub> est présente sur de nombreux leucocytes évoluant dans le système immunitaire inné et régule l'adhésion et la migration des leucocytes, mais également la phagocytose, le chimiotactisme et l'activation cellulaire, ce qui peut fournir au LB1 CD11b<sup>+</sup> un phénotype de macrophage ou monocyte-like. Les LB CD11b<sup>+</sup> sont par ailleurs majoritairement CD5<sup>-</sup> chez l'Homme, dans la circulation [334]

CD11b interagit ainsi avec ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales et au sein de la matrice extracellulaire. Kawai et al. en 2005 avait étudié les capacités migratoires des LB circulants en rapport avec l'expression de CD11b [335]. Il avait conclu que l'expression de CD11b jouait un rôle essentiel dans la migration des LB mémoires et dans les processus d'homing, mais il avait étudié un phénotype de LB basé sur CD27<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>, dont probablement un certain nombre étaient des LB1. Les LB1 CD11b<sup>+</sup> ont montré encore récemment des propriétés migratoires vers les tissus inflammatoires [336].

#### [a.3.1 Production des Ac naturels](#)

Chez la souris, les LB1 sont décrits comme étant les principaux responsables de la sécrétion d'Ac naturels (nIgM, nIgG3 ou nIgA). Cette principale fonction des LB1 est spontanée [314]. En l'absence d'activation, les nIgM représentent 80-90% des IgM sériques et les nIgA représentent 50% des IgA sériques.

Les Ac naturels sont des Ac polyréactifs pouvant cibler naturellement des Ag étrangers, généralement très conservés entre espèces, mais également des Ag du soi [322, 337]. Cette auto-immunité est naturelle et est rencontrée en l'absence de pathologie [338]. Ainsi, les LB1 répondent à certains composants du soi altérés et aux DAMPs, comme les fragments de collagène. Cette sécrétion a donc un rôle dans le maintien de l'homéostasie et son aspect autoréactif accélère l'élimination des cellules mortes et des débris cellulaires [314].



Les anticorps naturels des LB1 de souris diffèrent des anticorps adaptatifs des LB2 notamment au niveau du répertoire, et de la structure. Ils ont une affinité relativement modeste, mais la résolution de certaines infections expérimentales dépend de l'action des Ac produits par les LB1 et LB2[314].

Les IgM naturelles sont des structures pentamériques, polyréactives et capables de reconnaître des structures hautement conservées. Elles forment un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. : elles se fixent sur les agents pathogènes et les neutralisent, participent à l'élimination des cellules apoptotiques, activent le complément, en participant à la formation des complexes immuns, favorisent l'immunité adaptative via les LB, l'immunité innée via les NK, contrôlent l'inflammation et participent à la régulation du LB et à l'homéostasie. L'absence d'IgM naturelles chez la souris aboutit à une perte de la clairance des pathogènes et à la mort du sujet par infections massives [322].

Les IgG naturelles sont peu réactives et sont incapables de reconnaître et d'éliminer seules les pathogènes. Elles peuvent cependant collaborer avec les lectines via leur fragment Fc pour faciliter la phagocytose et la clairance des pathogènes, et contrôler la production de cytokines (réduction des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6, IL-8) et augmentation des cytokines anti-inflammatoires (IL-10). Elles ont également un rôle proactif fondamental sur la réponse immunitaire systémique innée qui reste à explorer dans les pathologies auto-immunes [322]. Les LPS bactériens peuvent ainsi être à l'origine d'une activation des LB autoréactifs et d'une sécrétion d'Ac naturels.

Les IgA sécrétoires produites par les plasmocytes ont un rôle crucial dans les muqueuses. Elles ont la capacité de se fixer directement aux bactéries et de traverser l'épithélium pour les présenter aux DCs. Elles contribuent ainsi, avec les défensines à la barrière épithéliale [339 , 340].

Les IgM sériques sont préférentiellement produites par les LB1 de la rate et il existe des migrations de LB1 entre la rate, le péritoine et la moelle osseuse qui régulent la production d'Ac naturels [314]. Les LB1 de la rate pourraient même être activés par une immunisation T-indépendante par un Ag pour devenir des LB mémoires qui résideraient dans la cavité péritonéale. Lors d'une représentation, elles retourneraient dans la rate et se différencieraient en plasmocytes Ag-spécifiques et hautement sécrétoires. Les LB1 du péritoine pourraient être ainsi des LB mémoires chez la souris, phénotype que l'on pensait inexistant chez les LB1[314].

La sécrétion spontanée d'Ac naturels par les LB1 protège ainsi l'organisme pendant la période de latence nécessaire à la formation d'un centre germinatif (CG) et à la production d'Ac adaptatifs. La réponse à l'inflammation de la rate amène à une production de LB1, à partir des progéniteurs B1 de la rate, avant le développement des LB2, et le BCR pourrait générer de manière autonome le signal de croissance cellulaire des LB1, en l'absence d'Ag.

#### **a.3.2 Réponse des LB1 aux signaux perçus par les TLR : production de cytokines, phagocytose et présentation de l'Ag.**

Les LB1 ont une sensibilité particulière aux signaux perçus par les TLR [328, 341]. Tous les LB expriment de manière différente les TLR, en fonction de leur phénotype. Les LB1 et les LB- ZM expriment plus particulièrement TLR2, 6 et 7 et des niveaux réduits de TLR8 [342]. Le déclenchement des TLR induit d'ailleurs une différenciation des LB1 et non des LB2 en plasmocytes matures et sécréteurs d'anticorps naturels afin de contrôler la charge bactérienne en attendant que la réponse adaptative se mette en place [343]. Lors d'une infection, une haute dose de ligands des TLR et des signaux liés à l'activation du CD40 peuvent sortir les LB1 de leur état anergique et les activer. Cette indépendance aux LT les relie à la phase innée de la réponse immunitaire.

L'action des LPS est mitogène sur les LB2 et amène à une activation et à une expansion clonale de ces cellules, indépendamment de leur réactivité au BCR. La prolifération et la sécrétion d'Ac chez les LB1 sont variables en fonction des ligands TLR ; elle est cependant plus importante que pour les LB2, mais moins intense qu'en réponse au Cpg [343].

La stimulation des LB par les TLR influe sur la réponse des LT par la sécrétion de cytokines, mais également par l'expression de molécules costimulatrices impliquées dans l'interaction avec les LT (CMH-II, CD40, CD80, CD86), mais également l'expression de nouveaux TLR (TLR 4 et 9) ou l'augmentation des TLR déjà présents, ceci en fonction du type de stimulation. Ainsi la stimulation du TLR4 du LB1, par un LPS bactérien aboutit chez la souris à une différenciation en phagocyte. L'engagement des TLR aboutit également à une sécrétion d'IL-6 et d'IL-10, qui ont des effets antagonistes au cours de la réponse immunitaire [344]. Sur les LB1, l'IL-6 est liée la production d'Ac par les LB1 et l'IL-10 joue un rôle négatif dans l'activation du BCR. La sécrétion des cytokines après un signal TLR est probablement importante dans le contrôle de la réponse des LB1 dans les phénomènes inflammatoires et peut prévenir le développement d'une réponse exacerbée aux auto-

antigènes [341]. Par ces stimulations croisées du TLR et du BCR et des cytokines, les LB1 vont activer les LT naïfs qui seront autoréactifs, et réguler leur stimulation via l'IL-10.

#### a.3.3 Stimulation des réponses des LT

Les LB1 ont également des actions suppressives et stimulantes sur d'autres acteurs du système immunitaire, notamment les LT naïfs. Ils induisent fortement l'activation et la prolifération des LT naïfs via une présentation de l'Ag aussi efficace que les DCs [333, 345]. Cela peut être attribué à une forte expression de CD86 et dans une moindre mesure de CD80 à leur surface, molécules importantes dans la co-stimulation des LT, comme nous l'avons déjà évoqué (Chapitre II.5.c.4.2.1).

Les caractéristiques des LB1 au repos sont donc similaires aux LB2 activés suite à la stimulation du BCR : le BCR est altéré chez les LB1 et contrairement aux LB2, sa stimulation n'induit pas de prolifération cellulaire ou d'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Une stimulation chronique du BCR amène donc à une forte expression de CD86 qui contribue à une présentation forte de l'Ag et à une stimulation efficace des LT.

Au-delà de la stimulation des LT naïfs, les LB1 peuvent influencer la fonction des LT, notamment en orientant leur différenciation en LTh17, producteurs d'IL-17, ou en LTh1 alors que les LB2 induisent une différenciation des LT auxiliaires en LTregs. [314, 346].

Enfin, la présentation des Ag et la stimulation des LT naïfs ne se déroulent pas forcément dans les OLS, mais pourraient avoir lieu dans les tissus inflammatoires, en plus de la réactivation des LT mémoires ayant déjà rencontré l'Ag.

#### a.3.4 Régulation des réponses des LT

Parallèlement aux capacités de stimulation des LT naïfs, les LB1 CD11b<sup>+</sup> ont montré des capacités à produire l'IL-10. Ils pourraient par ailleurs être une source de Breg ou B10 qui est une population de LB très hétérogène comprenant également des LB2 immatures et des LB-ZM [314].

Griffin et al., en 2012, montrèrent que les LB1 CD11b<sup>+</sup> sécrètent spontanément de l'IL-10 et régulent ainsi l'activité des LT. Ainsi les LB1 CD11b<sup>+</sup> sont orchestrateurs (LB1orc) et les LB1 CD11b<sup>-</sup>, sont sécréteurs (LB1sec) [323].

### **a.3.5 Différences LB1/LB2**

Les LB1 sont différents des LB2 sur plusieurs points, autres que leurs caractéristiques antigéniques de surface et leurs fonctions. Les LB1 sont plus grands que les LB2 et ont une résistance plus importante à l'apoptose. L'expression du CD27 est commune aux LB1 et aux LB2 mémoire, d'où la nécessité de discriminer les LB1, bien que représentant une faible population dans le sang par l'utilisation du CD43. CD43 est inductible sur les LB2, sous certaines conditions de stimulations, mais il est dans ce cas associé à l'expression de CD69 et CD70 qui sont ainsi des Ag discriminant des LB1. [314]. Les LB1 dans le sang représenteraient 2 à 4% des LB [314].

### **b. Ontogenèse des LB2.**

La lymphopoïèse des LB2 débute dans le foie fœtal avant de prendre place dans la moelle osseuse (organe lymphoïde primaire) dès la naissance. Les HSC sont à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines, notamment des lignées lymphocytaires. Les HSC (CD34<sup>+</sup>) sont ainsi à l'origine des précurseurs lymphoïdes communs (CLP) à l'origine de la lignée lymphoïde (cellules B, T et NK).

La première phase de différenciation et de maturation des LB est indépendante de l'Ag alors que la seconde phase d'activation et de différenciation finale est dépendante de l'Ag du soi, puis des Ag du non-soi en périphérie. Elle aboutit à la formation de plasmocytes et de LB mémoires spécifiques d'un Ag.

#### ***b.1 Génération de LB immatures dans la moelle osseuse***

À partir d'une cellule souche lymphoïde, plusieurs stades de développement se suivent avant d'aboutir dans les OLS à une différenciation en LB mature. Durant cette période de développement initial, un réarrangement génétique s'opère au niveau de l'expression de gènes codant pour la partie variable des Ig. Ces réarrangements génétiques, dits primaires, permettent d'obtenir de multiples versions des immunoglobulines dirigées contre une très grande variété d'Ag. La grande diversité du BCR (B-cell receptor) résulte du réarrangement ordonné des segments de gènes V, D, J du locus de la chaîne lourde de l'Ig, et de ceux des segments des gènes V et J du locus de la chaîne légère. Ainsi plusieurs stades de maturation se succèdent :

- **le stade Pré-Pro-B** : les précurseurs ne se sont pas totalement engagés dans la voie B et n'ont pas réarrangé les gènes des Ig. Les cellules expriment très faiblement RAG-1 et RAG-2, recombinaisons permettant la recombinaison V(D)J et le gène du CD79a est exprimé dès ce stade sous forme de protéine intracytoplasmique. Leur phénotype est CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>cKit<sup>lo</sup>.

- **le stade Pro-B** : les réarrangements des gènes d'Ig commencent à se mettre en place et deux sous-populations se distinguent en fonction de leurs degrés de maturation :

- le stade pro-B précoce, où apparaît le marqueur CD19.

- le stade pro-B tardif où les réarrangements de l'Ig se poursuivent

Leur phénotype est CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, IL-7/3R<sup>+</sup>, cKit<sup>lo</sup>.

- **le stade Pré-B** : le réarrangement se termine et un pré-BCR se forme à la surface et la cellule entre dans une phase d'expansion clonale. Le pré-BCR joue un rôle critique dans l'exclusion allélique en induisant une diminution transitoire de l'expression des gènes RAG et l'arrêt de la recombinaison des chaînes lourdes sur l'autre allèle. Les gènes RAG sont alors réexprimés pour réaliser les réarrangements des gènes des chaînes légères. Leur phénotype est CD10<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>IL-7/4/3R<sup>+</sup>cKit<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>.

Au stade du LB immature, les réarrangements sont terminés et une IgM de surface spécifique à un Ag est exprimée à la membrane plasmique. Elle constitue le BCR mature, un complexe membranaire avec un hétérodimère Igα/Igβ (CD79a, CD79b) servant de module de transmission du signal. Il est associé à un corécepteur du BCR constitué par 3 antigènes de surface (CD19, CD21, CD81). CD19 est un antigène de surface caractéristique de l'ensemble des populations des LB. Il est dit pan-B et est un marqueur phénotypique des LB. La constitution du BCR se fait par étapes et détermine les stades de maturation du LB.

Les LB immatures sont alors sujets à un processus de sélection négative au cours duquel les cellules possédant des immunoglobulines membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminées, limitant ainsi l'autoréactivité. L'environnement cytokinique au sein de la moelle osseuse est un élément important qui détermine les orientations du développement du LB immature. Leur phénotype est CD10<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>IL-4R<sup>+</sup>Ckit<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IL7R<sup>-</sup>.

Les cellules qui survivent quittent la moelle osseuse et migrent vers les OLS pour terminer leur maturation.

## *b.2 Migration des LB vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS)*

Les LB immatures quittent l'organe lymphoïde primaire, migrent dans le sang et rejoignent les OLS, notamment la rate chez la souris, lieu d'activation des lymphocytes naïfs, et point de départ de la réponse immunitaire adaptative.

Tous les LB immatures ne suivent pas ce cheminement et certains resteraient dans l'organe lymphoïde primaire ou pourraient migrer vers d'autres tissus [272, 276]. Ils seraient également à l'origine des LBregs /B10, régulateurs de la réponse immunitaire par la sécrétion d'IL-10 [276, 347].

Les LB immatures qui quittent la moelle osseuse sont appelés LB transitionnels.

Les OLS peuvent être des organes bien structurés, encapsulés, comme la rate et les ganglions lymphatiques (LN) et des structures plus diffuses, non encapsulées, comme les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT). Les amygdales, organisées en anneau (anneau de Waldeyer) autour du pharynx, sont les organes lymphoïdes de la région orale et pharyngée.

Au sein des OLS, la proportion de LB autoréactifs passe de 40% à l'entrée dans les OLS à 20% chez les LB matures naïfs [348]. Une sélection positive des LB non autoréactifs est réalisée au détriment des LB autoréactifs [349]. Au sein des OLS, se distinguent les zones extrafolliculaires, LT et DCs, des zones folliculaires B où se forme les CG.

### *b.2.1 Les LB transitionnels*

Les LB transitionnels sont des cellules transitoires immatures qui transitent vers la rate où elles se développent [350]. Ce sont des formes intermédiaires entre les LB immatures et les LB matures qui vont subir une sélection négative (sélection périphérique) dans le compartiment B périphérique [351]. 3 stades successifs sont définis :

- LBT1 avec pour phénotype  $CD19^+ IgD^{lo} IgM^{hi} CD27^-$   
 $CD10^{hi} CD24^{hi} CD38^{hi} MTG^+ CD5^+ CD21^{lo} CD23^{lo}$ . Ils sont rencontrés dans la moelle osseuse, dans le sang et la rate, mais pas dans les LN.
- LBT2 avec pour phénotype  $CD19^+ IgD^+ IgM^{hi} CD27^-$   
 $CD10^+ CD24^{hi/+} CD38^{hi/+} MTG^+ CD5^{lo} CD23^{hi} CD21^{hi}$ . Ils sont restreints à une localisation splénique.
- LBT3 avec pour phénotype  $CD19^+ IgD^{lo} IgM^{lo} CD27^{+/-}$   
 $CD10^{lo} CD24^{+/-} CD38^{+/-} MTG^+ CD5^+$

Ils sont caractérisés par l'expression d'une IgM et une IgD de surface et peuvent être distingués par l'expression de CD23 et de l'IgM [350]. En plus du signal tonique du BCR (activation du BCR par l'Ag), des facteurs extracellulaires sont nécessaires pour que les LB transitionnels complètent leur développement. BAFF (B-cell activating factor) est un important régulateur de la maturation du LB transitionnel chez la souris, notamment de la transition LBT1-LBT2 [15]. La stimulation de BAFF-R augmente l'expression des gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mc-1) via la voie NF-κB et augmente ainsi l'expression de CD21 et de CD23. Cependant, il semblerait que chez l'Homme, BAFF n'affecte pas la survie du LBT1 et que l'IL-4 tient ce rôle dans la moelle osseuse [350]. De plus, la stimulation du BCR, associé à l'IL-4 ou au CD40L, en présence de LT peut induire la progression dans le cycle cellulaire.

Récemment, une fonction régulatrice a été mise en avant chez certaines populations de LB transitionnels. En effet, les LBreg ou B10 partagent des similitudes phénotypiques et fonctionnelles (CD24<sup>hi</sup>, CD38<sup>hi</sup>, IL-10<sup>+</sup>) [347]. Les LBT3 sont considérés comme faisant partie du pool des LB matures et deux sous-populations de T3 sont décrites par Simon et al. en 2016 [347] :

- une population T3 IgM<sup>lo</sup>, IgD<sup>lo</sup>, CD10<sup>lo</sup> qui a fonctionnellement un statut similaire aux cellules anergiques.
- une population T3 CD27<sup>+</sup> qui a des capacités de répondre rapidement aux stimuli T indépendants et qui secrète des nIgM, comme les LB innate-like (LB1) [343]

Les progéniteurs et effecteurs B10 pourraient coexister avec les LB transitionnels humains [352]. La population de LBT3 CD27<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>, ainsi qu'une population de LB mémoire IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>, sont capables de produire de l'IL-10 [347]. De plus, la population de LBT3 anergiques serait également capable de supprimer l'immunité humorale par des mécanismes indépendants de l'IL-10. [347, 353].

### **b.2.2 Les LB pré-naïfs**

Les LB pré-naïfs ont été décrits récemment comme étant une sous-population intermédiaire entre les LB transitionnels et les LB naïfs, à la fois phénotypiquement et fonctionnellement [354]. Ainsi, leur BCR ne peut répondre à une stimulation, mais ils sont capables de répondre à une stimulation par le CD40. Une collaboration avec les LT CD4<sup>+</sup> activés résulte en une différenciation en plasmocyte et à la sécrétion d'Ac. Les LB pré-naïfs

ont donc pour phénotype CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27-IgD<sup>+</sup> [276].

Les fonctionnalités des LB pré-naïves ne sont pas encore claires, mais il semblerait qu'elles soient dotées de fonctions autorégulatrices (production d'IL-10 et d'auto-anticorps IgM) [276, 355]. Elles correspondraient aux LBT3 décrites précédemment.

Le déficit de sécrétion d'IL-10 peut être une voie d'activation de l'auto-immunité, notamment lorsque le système immunitaire est intensément activé (BAFF élevé, hyperexpression de CD40L et IL-21 élevée) [276, 355].

### **b.2.3 Les LB naïfs**

Les LB naïfs sont des LB matures qui n'ont pas encore rencontré l'Ag dont ils sont spécifiques. Le phénotype caractéristique est IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>. La rencontre avec l'Ag spécifique va aboutir la stimulation de leur BCR. Ils seront pleinement activés après la rencontre avec un LT de la zone T, également préalablement par une DC présentant l'Ag.

L'expression de l'IgM de surface par les LB naïfs peut subir une commutation isotypique vers une IgG1, une IgG3 ou une IgA sous l'induction de cytokines (IL-4, IL-10, IL-21), et de CD40L et induire une sécrétion de cytokines [356, 357]. Une capacité à se différencier en plasmocytes directement sécréteurs d'Ac est même décrite [358].

Par ailleurs, la plupart des LB dans les tissus non lymphoïdes sont naïfs et il existerait une recirculation des LB naïfs entre les tissus [359].

## **b.3 Activation des lymphocytes B dans les OLS**

L'activation des LB est dépendante du microenvironnement moléculaire, notamment cytokinique, des signaux perçus par les TLR et de la présentation des Ag. Il existe donc des voies d'activation directement dépendantes du BCR (liaison paratope-épitope), et d'autres non directement dépendantes du BCR.

### **b.3.1 Stimulation par le BCR**

#### **b.3.1.1 Signal tonique du BCR**

Le pontage d'au moins deux BCR amène à l'activation des molécules de signalisation CD79a et CD79b et notamment à une production accrue des constituants du CMH-II. L'antigène avec son BCR est internalisé par pinocytose, l'Ag est apprêté et les peptides antigéniques sont présentés à la surface, associés au CMH-II.



L'activation du BCR est modulée par des signaux indépendants du BCR, notamment au niveau des corécepteurs du BCR (CD19, CD81, CD21) (activation de la prolifération B par la fixation sur CD21 du CD3d du complément associé à un micro-organisme) ou du CD32B (la liaison d'une Ig via sa partie Fc sur le CD32B ou FcγR-IIb inhibe la maturation et l'activation cellulaire).

#### b.3.1.2 Interactions LT-LB : réponse thymo-dépendante

Les réponses thymo-dépendantes aboutissent à la mise en mémoire ou à la différenciation des LB activés dans les OLS. Ses interactions ont lieu dans les phases primaires et lors de la réexposition aux Ag.

Dans les phases primaires, le LB ayant rencontré l'Ag migre du follicule B vers la périphérie de la zone T, en présentant le complexe peptide-CMH-II. Un LT naïf a déjà été préalablement activé par une DC de la zone T et migre à la rencontre du LB. Cette interaction est complétée par l'expression des mêmes molécules de stimulation qu'entre la DC mature et le LT naïf (Chapitre II.5.c4.1) (CD80/CD86/CD28 et CD40/CD40L). Au cours de cette étroite interaction, le lymphocyte B reçoit de la part du lymphocyte T des signaux nécessaires à sa prolifération et à sa maturation, comme l'IL-2, 4, 5 et 6. [360].

Dans les phases de réexposition à l'Ag, ou phases secondaires, les LB mémoires représentent aux LTfh apparentés et de nouveaux LB mémoires et plasmocytes sont produits.

#### b.3.1.3 Formation des centres germinatifs (CG)

Les LB activés prolifèrent. Certains se différencient en plasmocytes de courte durée de vie qui donneront naissance aux foyers extrafolliculaires, et d'autres se développent en LB mémoires et restent en dehors du CG, mais dans le follicule (Germinal Center Indépendante Humoral Memory). Une autre partie des LB activés forme également un CG dans le follicule et y subit une prolifération [360].

Deux zones sont distinguées au sein d'un CG : la zone sombre et la zone claire. Dans la zone sombre du CG, l'expansion clonale des LB activés (centroblastes) s'accompagne d'une diversification du BCR par hypermutation somatique afin d'augmenter l'affinité du BCR, sous l'action de l'AID (Activation-Induced cytidine deaminase) [361]. Les LB qui quittent le cycle cellulaire se relocalisent dans la zone claire (centrocytes), où les LB qui expriment une forte affinité pour l'Ag seront sélectionnés par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) enrobées de complexes immuns et les LTfh (T follicular helper).

Dans les zones claires, une commutation de classe ou commutation isotypique (class switching) à lieu et aboutit à la synthèse d'IgG, d'IgA ou d'IgE à la place de l'IgM. L'organisation des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères de l'Ig se modifie et une nouvelle Ig est exprimée et sera sécrétée par la suite. La commutation isotypique peut également avoir lieu en dehors du CG lors de la formation de LB mémoires indépendants du CG [360].

Les LB du CG peuvent réintégrer le cycle du CG et proliférer. Il existe un échange permanent entre la zone claire et la zone sombre. Certains LB du CG sortent du CG, soit en tant que LB mémoire et restent dans le follicule (Germinal Center-dependant humoral memory), soit évoluent en tant que cellules plasmiques à longue durée de vie contribuant à la mémoire sérologique [360].

Autour du CG, la zone du manteau est décrite et est constituée par une population de lymphocytes, notamment de LB1.

La force des signaux reçus par les LB détermine les orientations de leur développement : un signal fort orientera les LB activés en plasmocytes ou en LB du CG alors qu'un signal plus faible détermine une différenciation en LB mémoire (signal faible) [360, 361]. La formation d'un couple de LB-LTfh suffisamment durable fournit une aide adéquate aux LT et permet aux LB de se différencier en LB du CG. Cependant si le temps de cette association est court, les LB seront amenés à rejoindre le pool des LB mémoires indépendants du CG [360].

La formation de ces deux types de mémoires permet d'avoir une population de LB mémoire très spécifique de l'Ag, issue du CG et une population avec une affinité proche, mais qui pourrait fournir une protection supplémentaire contre des pathogènes qui portent des Ag et des épitopes distincts, mais apparentés.

Les CG sont des structures qui apparaissent en quelques jours suite à la présentation de l'Ag et qui peuvent durer jusqu'à quelques semaines avant de disparaître. Elles sont ainsi hautement régulées par les LTfh, et des cytokines comme l'IL-21 ou l'IL-10 qui est un régulateur positif de Bcl6 qui est essentiel dans la formation des CG [360, 362]

### **b.3.2 Stimulation du lymphocyte B T-indépendante**

Une autre voie d'activation des LB permet d'aboutir de manière T indépendante à la formation de LB mémoires. Cette voie d'activation concerne principalement les LB1 et les

LB-ZM alors que les B2 sont principalement impliqués la stimulation thymo-dépendante [360].

Le rôle des signaux perçus par les TLR et du microenvironnement cytokinique est important dans la stimulation des LB T-indépendante. Les B2 expriment moins de TLR2, 6 et 7 et des quantités égales de TLR1, 4, 5 et 9 par rapport aux autres sous-ensembles de LB. De plus la stimulation des LB2 peut induire une prolifération alors que celle sur les LB1 et les LB-ZM peut induire une différenciation en plasmocytes [314].

Les TLR jouent ainsi un rôle crucial dans l'initiation des réponses immunitaires innées et la promotion de la réponse immunitaire adaptative [279]. L'expression des différents TLR à la surface est variable et peut être induite. Une première signalisation TLR peut induire l'expression de nouveaux TLR à la surface des LB, lui apportant ainsi des capacités de répondre à de nouveaux signaux perçus par les TLR, et de nouvelles fonctions. De même, certains s'associent et font varier les réponses suite à une activation par un LPS bactérien.

Ils ont un rôle crucial dans le développement des LB, puisque les HSC peuvent reconnaître les signaux perçus par les TLR et orienter leur développement vers une lymphopoïèse ou une myélopoïèse, afin de l'adapter au stress environnemental ou à la sénescence. Ce mécanisme peut fournir un avantage et permettre une réaction rapide face aux infections microbiennes [15, 279].

La signalisation TLR peut également avoir un rôle positif ou négatif dans le processus de sélection négative, en synergie entre l'activation par le BCR, aux stades précoces, mais également aux stades de LB transitionnels [279]. Il a ainsi un rôle de régulation des sous-populations de LB et dans l'ajustement du répertoire du BCR.

Sur les LB matures, la stimulation des TLR conduit à une prolifération et à une différenciation en plasmocytes, mais également à la production de cytokines : l'activation des TLR2, TLR4 et TLR9 dans les LB induit les LB2 à sécréter IFN- $\gamma$  et de l'IL-6 [363].

#### *b.4 Dynamique des lymphocytes B dans les centres germinatifs*

Les CG sont des structures dynamiques où les LB migrent constamment entre les différents compartiments cellulaires afin d'obtenir de la part des autres cellules résidentes, les signaux requis pour leur survie. Ces mécanismes sont finement régulés par l'environnement stromal (Signaux perçus par les TLR, chemokines CXCR4/CXCL12 et CXCR5/CXCL13 pour la migration cellulaire) et les LTfh qui soutiennent la sélection dans le CG afin de favoriser l'expansion ou la contraction des populations clonales en fonction de l'affinité de leur BCR pour l'Ag. La maturation des différentes sous-populations de LB matures au sein des CG peut être caractérisée par le différentiel d'expression IgD/ CD38 [272].

| Sous-Populations                         | IgD | CD38 | CD23 | CD27 |
|--|-----|------|------|------|
| <b>LBm1 (naïf)</b>                       | +   | -    | -    | -    |
| <b>LBm2 (activé)</b>                     | +   | +    | +    | -    |
| <b>LBm2' (CG)</b>                        | +   | ++   | +    | -    |
| <b>LBm3 (centroblaste)</b>               | -   | ++   | -    | -    |
| <b>LBm4 (centrocytes)</b>                | -   | ++   | -    | -    |
| <b>Early LBm5 (anticorps ou mémoire)</b> | -   | +    | -    | -    |
| <b>LBm5</b>                              | -   | -    | -    | +    |

*Sous-populations de LB matures (D'après [272])*

Les LB transitionnels continuent leur maturation au sein des OLS selon deux voies distinctes : la formation des LB folliculaires (LB-Fo) et celles des LB-ZM. Les LB-ZM ne représentent que 20% de la population B dans la rate [364].

Les LB-Fo représentent 80% des cellules B de la rate adulte et ont la capacité de coloniser les ganglions lymphatiques. Ils représentent les précurseurs de l'ensemble des LB2. La différenciation en LB-Fo ou en LB-ZM dépend de la stimulation du BCR, de Notch2, de BAFF-R et de l'activation de la voie NF-κB, ainsi que des signaux impliqués dans la migration cellulaire et la rétention anatomique des LB dans la zone marginale [364].

#### b.4.1 Les lymphocytes B folliculaires

Le phénotype des LB-Fo est CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD22<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD24<sup>+/lo</sup>CD10<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>lo</sup>IgD<sup>hi</sup>IgM<sup>lo</sup>. Deux sous-populations de LB-Fo sont décrites [364] :

- LB-Fo de type I (IgD<sup>hi</sup>IgM<sup>lo</sup>CD21<sup>mid</sup>CD23<sup>+</sup>), issus d'une maturation BAFF et BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) dépendante, après stimulation du BCR
- LB-Fo de type II (AA4.1-IgD<sup>hi</sup>IgM<sup>hi</sup>CD21<sup>mid</sup>CD23<sup>+</sup>), issus d'une maturation BAFF et BTK indépendante, après une stimulation forte du BCR

Les LBT1 et LBT2 peuvent devenir matures sous l'influence de BAFF-R et de BTK chez la souris (IL-4 chez l'Homme). Les LBT2 se différencient en LB-Fo-I s'ils reconnaissent un antigène avec une haute affinité alors que ceux avec une faible affinité vont migrer et continuer leur maturation dans la zone marginale pour donner les LB-ZM. Une forte activation du BCR sans BAFF-R/BTK orientera la différenciation vers un LB-Fo-I.

Les LB-Fo-I et II vont participer aux réponses T dépendantes dans le follicule et aux réponses T indépendantes dans la moelle osseuse. Les LB-Fo-II peuvent être aussi un réservoir pour de futures LB-ZM lorsque les agents pathogènes véhiculés par le sang ont épuisé les LB-ZM [364]. CD21 correspond au récepteur au complément 2 (CR2), qui a pour ligand le C3d du complément ; il est moyennement exprimé sur les deux types de LB-Fo et de manière moins importante que sur les LB-ZM.

Après activation par leur rencontre avec l'Ag, les LB-Fo peuvent soit se différencier rapidement en plasmocytes à IgM à courte durée de vie, soit former en collaboration avec les LTfh des CG où ils subissent les processus d'hypermutation somatique et de commutation isotypique, avant de se différencier en LB mémoires ou en plasmocytes à longue durée de vie.

#### **b.4.2 Les lymphocytes B de la zone marginale.**

Le phénotype des LB-ZM est  $CD19^+CD1c^+CD1d^{hi}CD20^+CD21^{hi}CD27^+IgM^{hi}IgD^{lo}CD43^-CD23^-$ . Ils sont très sensibles au complément via CD21 et ils répondent aux pathogènes à diffusion hématogène [320, 365]. Le taux élevé de CD1d facilite la présentation des Ag lipidiques au iNKT (Invariant NK T cell) dans la zone marginale de la rate, chez la souris.

Un des rôles des LB-ZM est de capter dans la zone marginale des complexes immuns et de faciliter leur transport de la circulation vers les zones folliculaires. Les fDCs les captent et les présentent aux LB-Fo [366]. Les LB-ZM ont par ailleurs des propriétés fonctionnelles similaires aux LB mémoires, notamment un phénotype préactivé et une capacité de s'autorenouveler [365].

Ils sont donc impliqués dans les réponses humorales T indépendantes.

#### **b.4.3 Mécanismes d'exclusion cellulaires des lymphocytes B dans le centre germinatif**

Une forte signalisation du BCR active BTK, qui à son tour active la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et ordonne aux LB de ne pas répondre aux signaux via Notch2. La stimulation de BAFF-R est nécessaire pour la survie des LB, mais n'est pas à l'origine de l'engagement vers le phénotype LB-Fo-I. Une très forte activation, sans stimulation de BAFF-R aboutit au phénotype de LB-Fo-II.

Une faible signalisation du BCR ne bloque pas la voie Notch2. La voie NF- $\kappa$ B est donc stimulée par BAFF-R et peut amorcer la différenciation vers le LB-ZM. Bien que la signalisation BCR est faible, l'acquisition du phénotype de LB-ZM nécessite également

d'autres voies de signalisation, notamment l'interaction de delta-like 1 (DL1) exprimé par les cellules endothéliales des veinules pulpaire rouges avec Notch2 sur les LB en développement. Cette interaction conduit à l'activation des facteurs de transcription Mastermind-like 1 (MAML1) et RBP-Jκ. Un récepteur de serpentine couplé Gα12 ou Gα13, probablement le récepteur de sphingosine 1-phosphate (S1PR1), et la signalisation de l'intégrine contribuent aux processus de migration et de rétention dans la zone marginale, bien que l'identité du facteur chimiotactique impliqué reste à déterminer.

#### b.4.4 Cellules sécrétrices d'anticorps : les plasmablastes et plasmocytes

Les plasmocytes sont les cellules sécrétrices d'Ac issues de la différenciation terminale des LB. Elles se forment dans les OLS et migrent ensuite dans les tissus périphériques, dans les états pathologiques, mais cette différenciation peut également avoir lieu localement. Les plasmocytes sont caractérisés par la perte de l'expression du CD20 et l'expression du CD138, dans les formes matures. Le CD20 est présent dès le stade pro-B et il a pour fonction d'optimiser la réponse B, plus particulièrement contre les Ag dans les réactions T indépendantes [367]. CD138 correspond au syndecan 1, une protéine transmembranaire de type 1 dont l'activation induit des modifications au niveau de l'organisation du cytosquelette, et participe à la migration et à la prolifération cellulaire, ainsi qu'aux interactions cellules-matrice extracellulaire [368]. CD38 est constamment exprimé par les plasmocytes et a des fonctions dans l'adhésion cellulaire, la transduction du signal et la signalisation calcique.

Il existe plusieurs phénotypes de plasmocytes [369, 370]

- les plasmablastes, qui sont des plasmocytes immatures à durée de vie courte et qui secrètent des Ac. Leur phénotype est CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>CD138<sup>-</sup>
- les plasmocytes, de longue durée de vie. Leur phénotype est CD19<sup>+/+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>CD138<sup>+</sup>

Au sein des OLS, tous les types cellulaires B présents, LB1, LB-Fo et LB-ZM peuvent être à l'origine de la formation de plasmablastes et de plasmocytes [332], même si les mécanismes pour les LB1 et les LB-ZM sont mal caractérisés [369]. Tous les sous-ensembles de LB matures expriment fortement les facteurs de transcription PAX5, BACH2 et PU.1-IRF8. La stimulation du BCR induit de faibles niveaux d'IRF4. Les LB ainsi activées sont

capables d'une prolifération rapide, associée à une recombinaison des Igs et une commutation de classe.

La différenciation en plasmablastes de courte durée de vie est caractérisée par une expression accrue d'IRF4, de XBP-1, une expression moyenne de BLIMP-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) et de l'Ac sécrété. Les LB-Fo peuvent également augmenter l'expression de Bcl-6 et réprimer l'expression du IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) pendant les réactions au sein du CG. Les LB avec un BCR de haute affinité à l'Ag quittent le CG et se différencient en LB mémoire ou en plasmocytes de longue durée (BLIMP-1<sup>+</sup>, IRF4<sup>hi</sup> et XBP-1<sup>+</sup>)

L'orientation vers les différentes voies est dépendante des signaux extérieurs (TLR, cytokines dont IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-21), et de la stimulation du BCR, notamment la régulation de l'antagonisme Bcl-6/BLIMP-1 et l'orientation vers la voie plasmatique ou LB mémoire [214, 371, 372, 373]

Les plasmocytes à longue durée peuvent migrer dans la moelle osseuse où ils peuvent devenir quiescents et les plasmablastes aller dans les tissus cibles et y sécréter des Ac [374], et des cytokines [375].

#### **b.4.5 Les lymphocytes B mémoires**

Le LB mémoire est généralement caractérisé par l'expression membranaire de CD27, un membre de la superfamille des TNFR. Son ligand est le CD70 et son activation aboutit à l'activation de la voie NF-κB et MAPK8/JNK, transmise par TRAF2 et TRAF5. SIVA1 (Apoptosis regulatory protein Siva) interagit avec CD27 et peut induire l'apoptose cellulaire.

Le LB mémoires forment une population très hétérogène aux fonctions multiples. [360, 376-378]

Ainsi, quatre principales populations de LB mémoires sont distinguées

- les LB mémoires doubles négatifs (DN) : CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>
- les LB mémoires Non Switchés (USw) : CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>
- les LB mémoires IgM only : CD19<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>
- les LB mémoires Switchés (Sw) : CD19<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>

La plupart des LB mémoires humains, sont généralement localisés dans la zone marginale des OLS, mais certains sont décrits également dans le follicule, non mutés [379]. En périphérie, ils sont localisés en sous et en intraépithélial [378], notamment dans les gencives (sous l'épithélium en regard des LT situés au niveau de la lamina dura) [156]. Ils

résident en tant que LB mémoires au repos, après une sélection initiale vraisemblablement dans les OLS. Il existe par ailleurs une recirculation dans le sang de LB mémoires, mais il est difficile de savoir si cette population reflète réellement les populations liées aux tissus [378].

Les populations switchées correspondent aux LB mémoires qui ont subi la commutation isotopique dans le CG, c'est-à-dire le changement de l'Ig de surface IgM en IgG ou IgA. Il existe également des populations mémoires  $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$  avec des fonctionnalités spécifiques, non dépendante de l'Ig, et probablement issu des LB-ZM [380, 381].

L'hétérogénéité des LB mémoires dépend, non seulement de l'expression de IgD/IgM/CD27, mais également sur l'expression de l'Ig de surfaçage (IgM, IgG, IgE, IgA), après commutation de classe. La longévité et les fonctions des LB mémoires varient en fonction de l'Ig présentée.

L'une des principales propriétés des LB mémoires est leur capacité de réponse rapide et robuste à la réexposition à l'Ag. Ces capacités sont extrêmement régulées et les LB mémoires présentent une sorte de bifonctionnalité pour fabriquer efficacement des cellules effectrices tout en maintenant simultanément l'état de mémoire sensible [360]. Les LB mémoires  $\text{IgG}^+$  ont une propension à se différencier plus en plasmocytes que les LB mémoires  $\text{IgM}^+$  qui seraient plus sources du renouvellement de la mémoire [360].

La mise en mémoire commence dès la phase primaire. Au fur et à mesure que l'antigène est éliminé, des LT mémoires à spécificité antigénique et des LB mémoires sont générés. Certains LB mémoires résidents adjacents aux CG contractés. Les cellules T mémoires dérivées des LTfh (LTfh mémoires), sont localisées aux frontières T et B ou dans les follicules des cellules B à proximité des LB mémoires.

Après réexposition de l'antigène, les LB mémoires activent les LTfh mémoires et l'ensemble forme un CG secondaire. Dans la réponse secondaire, des taux élevés d'anticorps IgG spécifiques de l'antigène sont produits en quelques jours, bien plus rapidement que dans la réponse initiale [360].

#### *b.5 Régulation de la différenciation lymphocytaire*

Les premières étapes du développement des lymphocytes sont dépendantes du microenvironnement cytokinique déterminé par les cellules stromales de la moelle osseuse, notamment le système BAFF/ TACI/APRIL/BAFF-R/BCMA et les différentes cytokines (IL-4, IL-10, IL-7, IL-21).



BAFF est un puissant activateur des LB et son action est un facteur essentiel dans la prolifération et la différenciation des LB. Elle se présente sous la forme d'une protéine transmembranaire de 285 acides aminés de la famille des ligands du TNF. Elle a plusieurs récepteurs d'affinité différente (TACI, BCMA et BAFF-R) et un agoniste (APRIL qui se lie avec TACI et BCMA uniquement). BAFF peut également être clivé et existe ainsi sous forme soluble. [382]

Son action sur BAFF-R permet la survie cellulaire et la maturation des LB immatures chez la souris. BCMA intervient dans la survie des plasmocytes et TACI dans les réponses T indépendantes, la régulation des LB et la commutation de classe. Ainsi la liaison de BAFF sur BAFF-R et BCMA contrecarre l'apoptose [383].

Un niveau élevé de BAFF, et d'APRIL est reporté dans les parodontites et ils induiraient une augmentation de la perte osseuse en induisant la survie de LB exprimant RANKL. La sécrétion d'APRIL se fait principalement dans l'épithélium et BAFF dans le tissu conjonctif [384]. L'augmentation de BAFF et APRIL peut être induite par les LPS bactériens [383].

## **2- Phénotype hétérogène des LB : les B régulateurs**

Le LB régulateur (LBReg ou B10) est une sous-population hétérogène de LB ayant un rôle majeur dans la modulation de la réponse immunitaire, contre les agents infectieux ou tumoraux [385-390]. Leur rôle est majeur dans les maladies auto-immunes [385, 391].

À l'instar de leurs homologues T, elles sont caractérisées par une sécrétion d'IL-10, mais aussi de TGF- $\beta$ , l'expression de CD25, de CD86 et d'autres marqueurs membranaires en fonction des auteurs et de leurs origines. En effet, de multiples sous-populations de LB peuvent sécréter de l'IL-10 et être des LBregs.

Ainsi chez l'humain, différentes sources d'IL-10 par les LB sont décrites [386, 390] :

- les LB CD24<sup>hi</sup>, CD38<sup>hi</sup>, notamment les LBT2, précurseur des LB-ZM [388],
- les LB CD24<sup>hi</sup>, CD27<sup>+</sup>, notamment certains LBT3 [347].
- les LB CD38<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD147<sup>+</sup>GRB<sup>+</sup>
- les plasmablastes CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup>
- les CD19<sup>+</sup>Tim1
- les LB1 CD11b<sup>+</sup> [323]

La dénomination de LB10 diffère suivant les auteurs, mais il semblerait que le dénominateur commun soit le phénotype CD1d<sup>hi</sup> CD5<sup>+</sup>, chez la souris et l'Homme [314, 386-]

, 388, 389, 392]. Ils constituent ainsi des précurseurs des LB-ZM [314]. Chez l'Homme, seule la production d'IL-10, de TGF- $\beta$  et d'IgG4 a été montrée [388].

Les fonctions suppressives des LBregs suivent plusieurs mécanismes faisant intervenir la libération de cytokines (IL-10, IL-35, TGF- $\beta$ ), d'Ig, et des interactions intercellulaires. Elles ciblent principalement les LT CD4<sup>+</sup> activés et bloquent leur différenciation ou leurs sécrétions [388], mais également les DCs et les autres populations de LT, via l'IL-10 et le TGF- $\beta$  [386].

Le développement et l'activation des LBregs sont méconnus. Ils sont sous la dépendance du CD40, des signaux perçus par les TLR, et des cytokines (IL-21, 6, 35 et 1 $\beta$ ) [386]

### **3- Lymphocytes B et inflammation chronique**

L'hématopoïèse centrale, notamment le développement des LB immatures, est un processus hautement régulé par l'environnement cytokinique au sein de la moelle osseuse. La présence d'une inflammation aiguë affecte l'hématopoïèse centrale et permet un recrutement approprié de cellules immunitaires pour permettre la guérison tissulaire et le retour à l'homéostasie. Lorsque les processus inflammatoires perdurent et se chronicisent, l'inflammation peut devenir protectrice ou pathogène [15]. Cette impossible résolution de l'inflammation liée à la persistance du pathogène amène au développement local de la réponse inflammatoire, voire d'un organe lymphoïde tertiaire. [15, 233].

L'inflammation, en altérant l'environnement cytokinique au sein de la moelle osseuse, redirige alors l'hématopoïèse centrale pour favoriser la myélopoïèse et mobiliser le développement des LB dans le sang et les sites lymphoïdes périphériques. Une lymphopoïèse peut se produire au niveau extra médullaire, notamment dans les OLS, pour produire des LB immatures. En périphérie, les mécanismes de tolérance des LB sont moins efficaces et le risque d'accumulation de LB autoréactifs est accru, et donc de mécanismes auto-immuns dans le cadre d'une inflammation chronique.

Ainsi, Ueda et al. en 2004 mirent en évidence les mécanismes de développement des LB matures dans la rate, dans des conditions inflammatoires et une inhibition du développement des LB dans la moelle osseuse, au profit du développement granulocytaire [393]. Le TNF- $\alpha$ , potentialisé également par l'IL-1 $\beta$ , réduit l'action du CXCL12, chémokine

ayant un rôle important dans le chimiotactisme des lymphocytes, dans l'angiogenèse et la migration des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse.

#### **4- Lymphocytes B et maladies parodontales.**

Les LB dans les maladies parodontales ont été étudiés depuis les années 1970. Les maladies parodontales ont souvent été présentées comme étant des maladies mêlant à la fois des mécanismes protecteurs et des mécanismes destructeurs [394]. Les fonctions des LB et leurs conséquences sur la pathogénie peuvent également mettre en lumière ce double rôle [33, 34].

Au fur et à mesure des recherches sur les B, les questions posées depuis les travaux de Page & Shoerder étaient [3] furent :

- Quels sont les mécanismes qui sous-tendent la prédominance des LB dans les lésions des parodontites ?
- Quelle est la fonction des LB dans la pathogenèse parodontale ?
- Les LB sont-ils nécessaires pour la perte osseuse alvéolaire dans une parodontite ?

Nous avons déjà discuté dans un précédent chapitre (Chapitre II.6) de leurs localisations histologiques et nous allons présenter l'évolution des connaissances, d'un point de vue fonctionnel et phénotypique, sur les LB de 1974 à nos jours.

#### ***1974-1979 : Les parodontites sont dues à une conversion d'une lésion stable T en une lésion B.***

En 1976, Page et Shroöder reprirent les travaux effectués préalablement sur les évolutions histologiques des tissus parodontaux pour établir une classification anatomopathologique, et mettre en avant la présence prépondérante des plasmocytes dans les lésions avancées [32]. Dès 1974, puis en 1978, Mackler et al réalisèrent les premières études sur le rôle des LB et des LT du sang de patients atteints de parodontite ou de gingivite. Ils les cultivèrent in vitro avec de la plaque dentaire et mirent en évidence que les LPS stimulaient les LB chez tous les patients, mais que seuls les LB et les LT des patients atteints de parodontite montraient une augmentation de leur activité chimiotactique pour les monocytes en réponse aux antigènes. La combinaison des deux types cellulaires aboutissait à une réponse blastogénique, donc à une différenciation terminale des LB en plasmocyte. Ils publièrent par la suite sur les incidences des Ig portées par les LB et les plasmocytes dans les parodontites [93, 395].

Les destructions tissulaires observées dans les parodontites étaient dues à des mécanismes immunologiques, proches de l'allergie, et incluant notamment des rôles spécifiques aux LB, aux LT et au complément [92].

Seymour et al. en 1978, mirent en évidence que les lésions gingivales étaient caractérisées, contrairement aux LN, par une activité enzymatique des LB importante [94]. Ils confirmèrent ensuite que les plasmocytes étaient nombreux dans la gencive, avec une grande quantité d'enzymes lysosomiales. Ces cellules étaient associées principalement aux fibroblastes. Cependant, les zones cellulaires ne semblaient pas anatomiquement distinctes, suggérant ainsi une sécrétion responsable d'une destruction de la matrice extracellulaire. La sécrétion de MMPs par le LB était probablement ce qu'avaient observé Seymour et al. en 1978. Garant et al. en 1983 mirent de leur côté en évidence que les fibroblastes associés aux plasmocytes et aux lymphocytes dans des lésions chez le rat apparaissaient endommagés au contact des infiltrations lymphocytaires et plasmocytaires.[396], suggérant également un effet cytotoxique d'origine immunocytaire responsable de la dégradation du tissu conjonctif.

En 1979, Seymour et al. émirent ainsi l'hypothèse que les parodontites étaient caractérisées par la conversion d'une lésion stable riche en LT, vers une lésion plus agressive riche en LB [31]. Cette hypothèse fut vérifiée par la suite [397].

### ***1976 : les plasmocytes, locataires majoritaires des lésions parodontales.***

Le rôle des plasmocytes et l'interaction entre les LB et les LT continuèrent d'être étudiés dans les années 1980 [283, 284, 290, 398, 399]. Tanaka et al. en 1984 mirent en évidence que la libération du contenu des corps de Russel formés dans plasmocytes était liée à leur dégradation par des autophagolysosomes [283]. En 1990, Joachim parla de plasmocytes dégénérés associés à la production d'auto-anticorps (anti-collagène II) dans les parodontites juvéniles [284].

Les plasmocytes sont des cellules sécrétoires d'immunoglobulines, de cytokines, et de MMP et leur présence a été associée à la persistance de l'invasion par *Pg* [400]. D'après Berglundh et al. en 2005, les plasmocytes représentent 50% de l'infiltrat inflammatoire et les LB 18% [401].

#### **- sécrétions d'immunoglobulines.**

Les plasmocytes sont sécréteurs d'Ig. La répartition des différentes classes et sous-classes d'immunoglobuline a été étudiée depuis le milieu des années 1970. À cette époque, les parodontites étaient décrites comme des lésions associées à des LB IgD<sup>+</sup> [402] avec des taux

élevés d'IgG en réponse à de multiples bactéries [188, 403]. Le nombre de LB IgD<sup>+</sup> était important dans les lésions parodontales et leur nombre diminuait après traitement [402]. L'IgD est une immunoglobuline très conservée au niveau évolutif, associée à l'IgM, elle joue un rôle négatif dans la signalisation du BCR et est un marqueur de maturité, lorsqu'elle n'est plus exprimée [404, 405]. Ainsi, une importante part de LB immatures constitue les lésions parodontales.

Les IgG sont les principales Ig sécrétées, suivies des IgA [93, 395, 406-410]. Les sous-classes d'Ig ont été étudiées par la suite dans le sang ou le CGF [409, 411-414]. Les IgG1 et les IgA2 sont majoritaires dans le CGF et sont issues d'une production locale. Cependant, l'expression d'IgA1 est supérieure à la production d'IgA2. Une forte proportion de fragments Fab IgA1 a été relevée, suggérant une digestion bactérienne de l'IgA1 [414]. En 1999, il a été rapporté également que les IgG2 étaient particulièrement augmentées dans les parodontites juvéniles localisées (agressives localisées, suivant la classification de l'Armitage 1999), et seraient induites par Pg [413, 415]. Les IgG3 semblent plus ou moins exprimées que les IgG2 suivant les auteurs [411, 414, 416].

Par contre, les IgM et les IgE sont très faiblement retrouvées dans les gencives et leurs sécrétions n'augmentent pas dans les parodontites [406, 410, 417, 418].

Des fragments d'activation du complément (C1q, C3a, C3c) et des Ig (IgM et surtout IgG) peuvent former des dépôts suggérant la présence de complexes immuns dans les parodontites avancées [188, 407, 419]. Cela aboutit à une exacerbation des réactions et des dégradations tissulaires via l'activation du complément et l'activation des Fc Recepteur des cellules immunitaires innées, notamment des PN [3, 34]. Enfin, en 2014, la production locale d'IgG contre Pg dans les parodontites a été démontrée [420].

#### **- sécrétions des matrix métalloprotéinase (MMP) et dégradation de la matrice extracellulaire.**

Dans des conditions normales, les MMP participent au développement tissulaire au remodelage et à la cicatrisation, mais ils régulent également les cytokines et les molécules d'adhésion [34]. Dans les conditions pathologiques, la quantité de MMP augmente et provoque la destruction des tissus [421]. Ainsi, les MMP sont corrélées avec la gravité de la maladie parodontale [422].

Les LB, et notamment les plasmocytes libèrent des MMP, et particulièrement du MMP8 qui est en concentration importante dans les parodontites chroniques. [423, 424]

- sécrétions de cytokines par les plasmocytes, et les LB également.

Les plasmocytes produisent différentes cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et le TGF- $\beta$  [34]. Gemmell et al en 1998 analysèrent la production de cytokines des cellules extraites de la gencive parodontale, après stimulation par *Pg*. Ils mirent en avant que les LB produisent de l'IL-12 dans la lésion gingivale, une cytokine Th1 [425].

L'expression de CCL2/MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), de CCL3/MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 alpha), de RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) et d'IP-10 (interferon-gamma inducible protein 10), ou CXCL10, a été étudiée par la suite dans les parodontites [426]. RANTES, ou CCL5, et MCP-1 sont réduites lors de l'accroissement de l'inflammation, alors que CCL3/MIP-1 $\alpha$  est augmenté, en parallèle d'une augmentation des LB, des LT CD8<sup>+</sup> et des Mo. L'expression de CCL2/MCP-1 était particulièrement positive au niveau des capillaires en périphérie des infiltrats. L'augmentation de CCL3/MIP-1 $\alpha$  peut-être notamment associée à une sécrétion des facteurs ostéoclastogéniques par les LB activés et à la perte osseuse [139].

### ***1984 : Les LT régulent anormalement les LB dans les parodontites.***

Donaldson et al. en 1984 [427] mirent en culture des LB et des LT de patients sains, issus du sang, ou du cordon ombilical avec des bactéries Gram- et Gram<sup>+</sup> associés aux parodontites. Ils montrèrent que l'ensemble des lymphocytes, quelle que soit leur origine, avait une cinétique de réponse similaire aux bactéries parodontales. Une réponse précoce des LB (2-3 jours de culture) était mise en avant suivi d'une réponse des LT plus tardive (5-6 jours). La présence de LB et de LT était nécessaire pour induire la différenciation plasmocytaire et la réponse des LT semblait réduire la réponse des LB dans le temps.

Les LT apparaissaient alors avoir un rôle central dans le contrôle immunologique parodontal, notamment les LT CD4<sup>+</sup> qui étaient prédominants dans les sites stables ou sains [289, 428]. Cependant, les niveaux sanguins de LB et LT, et les ratios LT CD4/LT CD8 sanguins ne changeaient pas entre parodontites et sujets sains, et l'augmentation anormale des LB dans les sites actifs était liée à une régulation anormale des LB par les LT auxiliaires [289].

En 2001, une étude phénotypique et fonctionnelle a été réalisée sur des LB et des LT sanguins [429]. L'analyse des PBMC (peripheral blood mononuclear cells) entre patients sains, patients atteints de différentes formes de parodontites n'a pas mis en évidence de différences entre parodontites chroniques (n=3), agressives (n=16) et patients sains (n=20), au niveau du nombre de LB et LT, excepté une légère baisse des LT dans les parodontites

chroniques. La réponse blastogénique au PHA (phytohemagglutinin), une substance mitogène, était moins importante dans les parodontites que chez les patients sains, suggérant ainsi une réduction de l'activité fonctionnelle des LB et des LT dans les parodontites qui pourrait être d'origine génétique.

***1988 : Les lymphocytes B peuvent activer les lymphocytes T dans les parodontites.***

L'activation polyclonale des LB se déroule dans les tissus parodontaux ; elle aboutit à la sécrétion principalement d'IgG, mais également d'IgM et d'IgA et est dépendante des LT [430-432]. Les LB mémoires, préalablement activés par les Ag appropriés migrent dans les tissus parodontaux et se différencient en plasmocytes sécréteurs d'IgG [431].

Le rôle des PBA (Polyclonal B cell activator) issus de la flore parodontale est discuté. Les PBA ont été mis en avant au début des années 80 [430, 433], et sont présentés comme des stimulants des LB de la rate qui induisent une différenciation en cellules produisant principalement des IgM, mais aussi des IgG. Okada et al. en 1988 émirent l'hypothèse d'un rôle important des LT autoréactifs dans l'établissement de lésions parodontales riches en plasmocytes sécréteurs d'IgG : l'antigène Ia, qui correspond au CMH-II du soi, est augmenté sur les plasmocytes [431]. Au travers de cette étude, était simplement mis en avant le rôle du LB en tant que cellule présentatrice d'antigène permettant l'activation d'autres LT auxiliaires. Les PBA n'étaient pas encore caractérisés comme LPS ou des cytokines, même si les LPS étaient déjà décrits, mais comme antigènes. Les PBA furent attribués aux LPS et Hahn et al. en 1997 montrèrent qu'ils avaient un rôle important dans l'induction d'auto-anticorps [434]. Les effets du LPS sont importants pour la production d'Ac anti-collagène. Le rôle des LPS sur les TLR, notamment les TLR des LB1 autoréactifs était montré.

Mahanonda et al. démontrèrent que les LT pouvaient être directement activés par les LB en tant que CPA [435]. L'expression de CD80 et de CD86 augmente dans les parodontites, notamment au niveau des LB. Cette expression est régulée par le contact avec différentes bactéries parodontopathogènes, notamment *Pg*, *Pi*, *Aa*, *Av*. Au contact des LB activés, les LT CD4<sup>+</sup> sécrètent massivement de l'IFN- $\gamma$  et de faibles taux d'IL-5. L'infiltrat LB a donc des rôles possibles dans la régulation et la maintenance de la réponse des LT.

***1989 : Les lymphocytes B peuvent induire l'ostéoclastogénèse dans les parodontites.***

**- Les premières preuves du rôle des LB dans l'ostéoclastogénèse.**

Tew et al en 1989 évoquèrent le rôle d'interleukines, notamment l'IL-1 produite par les LB dans l'induction de l'ostéoclastogénèse [436]. Klausen et al. en 1989 également, réalisèrent une étude sur des rats SPF (Specific Pathogen Free) avec des profils immunologique différents [12]. 4 groupes furent étudiés :

- Rats congénitalement déficients en LT
- Rats avec un thymus reconstitué
- Rats traités pour induire une déficience temporaire en LB. L'irradiation des rats avait été réalisée à 5 semaines.
- Rats normaux

Après inoculation aux différents groupes de rats de 9 semaines avec des bactéries, parodontales, ils observèrent les résultats à 3 mois (types d'Ig, et perte osseuse), comparés à des contrôles non inoculés dans chaque groupe. Ils mirent évidence une augmentation des IgM et des IgG contre les bactéries inoculées, notamment pour le *Pg*. Leurs résultats semblaient mettre en évidence une destruction parodontale causée par la réaction humorale au *Pg*.

Ils notèrent deux résultats particuliers dans le groupe de rats temporairement déficients en LB :

- le groupe contrôle de ce groupe avait déjà une perte osseuse significativement plus importante que les autres contrôles de chaque groupe.
- la perte osseuse était plus importante dans le groupe déficient en LB suite à l'inoculation

Ils conclurent qu'une déficience en LT n'avait pas d'incidence sur le développement d'une perte osseuse parodontale. Cependant d'autres études avaient mis en avant une perte osseuse suite au transfert adoptif de LT sensibilisés [437].

L'augmentation de la perte osseuse avec une déficience temporaire en LB est expliquée par une diminution du rôle protecteur des LB, malgré les résultats des études précédentes qui l'associent à la sévérité des lésions [31, 433, 438]. De plus, la déficience de LB n'est que temporaire et incomplète, et la perte osseuse augmentée aurait pour origine une hyper réponse des LB restants.



### **- Le rôle de RANKL exprimé par les LB activés dans l'induction de l'ostéoclastogénèse**

Dès 2001, les concepts de l'ostéoimmunologie s'appliquèrent aux parodontites suite aux travaux de Arron et Choi en 2000[139, 140]. Choi et al. mirent en co-culture des LB et des LT activés ( $CD4^+$  et  $CD8^+$ ) avec des précurseurs ostéoclastiques, en présence de MCSF et de sRANKL. Les LB et les LT  $CD4^+$  activés, mais pas les LT  $CD8^+$  activés, induisirent une différenciation ostéoclastique en présence de MCSF [139]. Les LB activés exprimèrent plusieurs facteurs ostéoclastogéniques, dont RANKL,  $TNF-\alpha$ , IL-6, CCL3/MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein -1) et CCL7/MCP-3 (Monocyte Chemotactic Protein-3), alors que les LT  $CD8^+$  produisaient une quantité importante d'OPG. D'autres voies étaient probablement présentes pour bloquer la perte osseuse liée à l'action des LT  $CD8^+$  et ont été mises en évidence par la suite (Chapitre II.5.c.4.3).

Il semblerait par ailleurs qu'en présence de cytokines Th1 (IL-2,  $IFN-\gamma$ ), l'ostéoclastogénèse induite par les LB activés soit inhibée [439]. Les LB co-cultivés avec des LTh1 ou des LTh2 vont se différencier en LB sécrétant respectivement des cytokines Th1 et des cytokines Th2 [440]. Ainsi, la polarisation initiale du LT va modifier l'activation du LB et induire la sécrétion d' $IFN-\gamma$  qui est un modulateur négatif clé de l'ostéoclastogénèse.

Ainsi, les LB activés sont des inducteurs de l'ostéoclastogénèse et Kawai et al. mirent en avant, en 2006, que les LB et les LT étaient les sources principales de sRANKL dans les tissus parodontaux [147]. Cette capacité est caractéristique des LB et des LT gingivaux activés et n'est pas descendue sur les LB et les LT sanguins (PBMC) [147].

D'autres cytokines peuvent influencer l'induction de l'ostéoclastogénèse par les LB [441]. L'IL-7 stimule la production des facteurs ostéoclastogéniques (RANKL,  $TNF-\alpha$ ) par les LT. L'IL-7 a également un rôle majeur dans le développement du LB et la croissance des tissus lymphoïdes [442-447]. Ils mirent en avant que les LB étaient la principale source d'IL-7 dans les tissus parodontaux et qu'elle est par ailleurs augmentée sous l'action de l'IL-6. Ainsi les LB sont responsables de l'induction de l'ostéoclastogénèse dépendante des LT.

Les LB et les LT, ainsi que leurs interactions ont un rôle clé dans l'induction de la résorption osseuse [448].

### **- Le LB est l'orchestrateur de l'ostéoclastogénèse dans les maladies parodontales.**

Les précédentes études montraient un rôle des LB et des LT dans l'induction de l'ostéoclastogénèse dans les maladies parodontales, mais il semble que les LB induisent les

LT à produire RANKL via l'action de l'IL-7 [441]. Klausen et al. en 1989 avaient mis en avant que les LB seuls induisaient l'ostéoclastogénèse chez des rats SPF [12].

Han et al. puis Harada al. en 2006, mirent en évidence que le transfert adoptif de LB spécifiques de l'antigène bactérien chez le rat, suivi d'une exposition orale locale à la même espèce bactérienne (*Aa*), entraînait une perte osseuse parodontale dépendante de RANKL, montrant ainsi que les LB activés contribuaient à la perte osseuse [37, 449], même lorsque les rats receveurs étaient congénitalement athymiques et donc déficients en LT [37].

Baker et al. en 2009 étudièrent le rôle du LB dans l'induction de la perte osseuse par l'infection par *Pg* chez des souris IgD-Ko pathogen-free [35]. L'IgD-Ko est à l'origine d'une déficience incomplète des LB, et le blocage de l'IgD retarde la maturation des LB. L'IgD a un rôle de stabilisation de la liaison avec le LT CD4<sup>+</sup> lors de la présentation de l'Ag par le CMH-II [450], donc l'activation des LB par les LT est inhibée. Les souris IgD-Ko sont relativement protégées de l'induction de la résorption osseuse provoquée par *Pg*, donc les auteurs conclurent que les LB activés par les LT sont responsables de la perte osseuse. Par ailleurs, les LB IgD-Ko restaient relativement fonctionnels et produisaient des IgG, IgA et IgM contre le *Pg* et étaient probablement activés par d'autres voies.

Olliver-Bell et al. en 2015 étudièrent également l'induction de la perte osseuse par *Pg* chez des souris IgM-Ko ( $\mu$ MT) pathogen-free, en comparaison à des souris sauvages (WT)[36]. L'absence d'IgM à la membrane est à l'origine d'une absence de signal via l'activation du BCR qui se traduit par un déficit en plasmocytes. Ils ont ensuite analysé par cytométrie en flux la composition en LB des éluas de gencive et de LN, l'expression d'IL6, de TNF- $\alpha$  et de RANKL, ainsi que la perte osseuse alvéolaire, en comparant entre une souris infectée par *Pg* (PD) et une souris non exposée à *Pg* (non-PD).

Au niveau de la gencive, ils mirent en évidence un nombre similaire de LB et aucune différence de population LB dans les deux groupes à 6 semaines. Cependant, l'expression de RANKL était supérieure dans PD par rapport aux non-PD à 1 semaine. À 6 semaines, il n'y avait plus de différence d'expression entre les deux groupes. Ils mirent en évidence également une population LB1 (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD5<sup>+/-</sup>) plus importante que les LB2 dans les souris PD.

Au niveau des LN, ils mirent en évidence un nombre similaire de LB entre PD et non-PD à 1 semaine et une augmentation des LB à 6 semaines dans les souris PD. À 1 semaine, une plus grande quantité de CG est observée à 1 semaine pour les souris PD et cette quantité continue d'être plus importante à 6 semaines.

À 6 semaines, une perte osseuse alvéolaire est observée chez les souris PD, mais, et il n'y a pas d'IgG anti-*Pg* dans les souris non-PD.

Autre élément important, la perte osseuse est plus importante chez les souris  $\mu$ MT que chez les souris sauvages. Les auteurs conclurent ainsi que le LB avait un rôle majeur dans l'induction de la perte osseuse, notamment les LB1, et que cette perte osseuse est associée à de faibles doses d'Ag. Par ailleurs, l'absence de LB fonctionnels dans les  $\mu$ MT, aboutit également à une diminution de l'activation des LT.

### ***1991 : L'activation du lymphocyte B dans les parodontites***

#### ***- rôles des cytokines***

L'IL-1 avait été préalablement proposée comme lien entre le LB et l'activation de l'ostéoclastogénèse [436]. Takeuchi et al. en 1991 analysèrent l'expression de l'IL-2R (CD25) et HLA-DR, un composant du CMH-II sur les lymphocytes du fluide gingival (CGF), du sang et de la gencive [451]. Ils mirent en évidence que les lymphocytes des patients atteints de parodontite étaient hautement activés. L'expression de CD25, par les LT CD4<sup>+</sup> et les LB, était plus importante dans le CGF que la gencive et que le sang. L'expression gingivale était elle-même plus importante pour les LT CD4<sup>+</sup> et les LB que dans le sang. Les LT CD8<sup>+</sup> n'exprimaient pas CD25. HLA-DR étaient fortement exprimé par l'ensemble des LT dans le fluide gingival, notamment les LT CD8<sup>+</sup>. Les lymphocytes sont donc fortement activés dans les parodontites et sont reliés à la réponse immunitaire locale dans les parodontites. Ces constatations furent confirmées par la suite [293, 294].

Kono et al. en 1991 analysèrent les cytokines régulant l'inflammation locale dans les parodontites [416]. Ils mirent en avant l'induction des LB activés par les cytokines vers la synthèse polyclonale d'IgG ou d'IgA, notamment le rôle de l'IL-6. La différenciation des LB en plasmocyte est assurée par la liaison IL6/IL6-R et l'expression des IL6R sur les LB est médiée par les cytokines sécrétées par les GMC (Gingival Mononuclear Cells). Les GMC correspondent à l'ensemble des cellules mononuclées récupérées de la gencive et représentent un groupe cellulaire hétérogène qui produisent notamment l'IL-5 et l'IL-6 dans les tissus parodontaux inflammatoires, mais pas l'IL-2 et l'IL-4 [452]. Cette sécrétion peut différencier les LB d'un même sujet en plasmocytes sécréteurs d'IgA et d'IgG, dans le GALT [453]. La libération de cytokines liées à différenciation des LB en plasmocytes (IL-4, 5 et 6) est augmentée dans les parodontites [417]. L'une des sources d'IL-6 est le fibroblaste gingival activé [454]. Les fibroblastes gingivaux expriment CD40 qui est normalement exprimé par les cellules hématopoïétiques. La liaison au CD40L/CD40 active le fibroblaste et la sécrétion

cytokinique en présence d'un infiltrat lymphocytaire activé, dans des circonstances inflammatoires [454].

Récemment, APRIL et BAFF ont été décrits comme augmentés dans les parodontites par rapport à des gencives saines, soulignant ainsi une activation importante des LB et un maintien des plasmocytes [384, 455]

#### **- rôles des facteurs bactériens**

Malisson et al. en 1991 étudièrent les facteurs infectieux (Ag bactérien) et inflammatoires qui déterminaient l'accumulation plasmocytaire dans les parodontites [291]. Ils démontrèrent que cette accumulation dans les sites inflammatoires était favorisée à la fois par l'inflammation chronique, les facteurs de virulence bactériens et par la présentation d'un antigène spécifique.

Gemmell et al. en 1991 et 1992 mirent également en avant que l'activation des LB dans les parodontites était locale et tardive et qu'elle était variable en fonction des facteurs de virulence bactériens [293, 456]. Ils étudièrent par la suite la production de cytokines (IL-1, IL-6, TGF- $\beta$ ) par les GMC et leurs effets sur les LB après stimulation par *Fn* et *Pg* [457]. *Pg* active principalement la production d'IL-1 par les GMC et *Fn* celle de TGF- $\beta$ , alors que la production d'IL-6 ne semble pas être influencée par ces souches bactériennes.

Homayounfar et al. en 1999 montrèrent également que l'activation des LB par *Pi* aboutit à la production d'IgG et d'IgA, de manière dose dépendante pour l'IgG, sans observer de production d'IgM [458].

L'orientation des lésions parodontales est donc dépendante à la fois de la composition du biofilm, de sa virulence, mais également de la réaction inflammatoire propre à l'hôte. Les TLR participent à la modulation de la réponse des LB confrontés au LPS bactérien.

Le rôle des TLR sur les LB est étudié depuis la fin des années 1990 [279], notamment leur rôle dans la modulation des réponses B en fonction des LPS bactériens. Les LB n'expriment par nature TLR 2 et 4 dont l'activation promeut une inflammation systémique chronique. Cependant, une augmentation des TLR 2 et 4 sur les LB est constatée dans les maladies inflammatoires, suggérant ainsi un changement de l'expression des gènes suite à l'engagement des TLR [459].

En réponse à des combinaisons de TLR, les LB sécrètent différentes cytokines, mais aussi expriment de nouveaux TLR. Ainsi l'expression d'IL-1 $\beta$  et d'IL-10 est régulée par le TLR4, et l'expression d'IL-8 et de TNF- $\alpha$  est régulée par le TLR2. TLR2 et TLR9 régulent

l'expression du TLR4 mettant en avant des interactions croisées entre TLR pour le contrôle des différentes réponses des LB dans les parodontites [459].

Une des réponses notables des LB aux LPS bactériens, est l'augmentation de l'expression de RANKL et du sRANKL, dans les gencives de rats en présence de *Pg*, en parallèle d'une augmentation importante de la production d'IgG et IgA contre *Pg* [23].

#### **- Les rôles des DCs et des LT**

En 1999, Cutler et al proposa une nouvelle hypothèse sur l'activation des LB dans les parodontites [460]. *Pg* pénètre dans les épithéliums et entre en contact avec les DCs immatures. Ces dernières s'activent, internalisent *Pg*, mûrent et présentent le complexe peptide-CMH-II, et les molécules de costimulation.

Elles deviennent ainsi des stimulateurs potentiels des LT naïfs dans les OLS, notamment les LN régionaux. Dans les LN, les LT activés vont activer les LB qui vont retourner dans les tissus. Ainsi, dans les parodontites, il y a des activations locales des LB mais également des répercussions systémiques [461].

#### ***1992 : Les B CD5<sup>+</sup> en parodontologie – auto-immunité B dans les parodontites***

Afar et al. en 1992 confirmèrent la présence de lymphocytes activés et déterminèrent les sous-populations concernées [294]. Ils mirent notamment en avant une augmentation des LB CD5<sup>+</sup> dans les gencives et le sang. Les LB CD5<sup>+</sup> étaient considérés comme des LB autoréactifs, ou LB1a par analogie au phénotype murin, et leur présence en grand nombre suggérait une composante auto-immune dans les maladies parodontales. L'auto-immunité comme facteur étiologique des maladies parodontales était déjà discutée depuis 1965 [462], mais cette étude met en avant une possible auto-immunité B dans les parodontites, après qu'une auto-immunité T ait été proposée [431]. La présence d'auto-anticorps, anti-collagène I avaient cependant été détectée préalablement [463].

Sugawara et al. en 1992 étudièrent la fréquence et la distribution des LB CD5<sup>+</sup> au sein de la gencive et la production des auto-anticorps associés [295]. La présence de LB CD5<sup>+</sup> dans le sang des patients sains ou atteints de parodontite est faible et identique. Dans les deux catégories, les LB CD5<sup>+</sup> sont nombreux dans les gencives, et sont particulièrement augmentés dans les tissus parodontaux. Les LB CD5<sup>+</sup> sont situés sous l'épithélium de poche, dans le conjonctif et sont les principaux responsables de la sécrétion d'IgG et d'IgM anti-collagènes. Les niveaux d'IgM sont plus faibles dans le CGF que dans le sang, et identiques entre patients

sains ou atteints de parodontite. Par contre, il est constaté une augmentation de l'IgG anti-collagène à la fois dans le CGF que le sang, chez les patients atteints de parodontite.

Deux autres études confirmèrent par la suite cette augmentation gingivale des LB CD5<sup>+</sup> dans les parodontites [296, 297] et leur rôle dans l'auto-immunité des parodontites. Cette augmentation du nombre de LB CD5<sup>+</sup> était associée à une augmentation des taux gingivaux d'IL-10 et d'IL-6, supérieurs aux taux sériques [296]. L'IL-10 était reconnu comme un facteur promouvant les LB CD5<sup>+</sup>, et sa production était majeure également chez les patients atteints de parodontite, notamment associée au diabète de type I [464]. Son rôle régulateur n'était pas mis en avant, bien que connu [465-468]. Afar et Berglundh montrèrent, à l'inverse de Sugarawa et Aramaki, que les LB CD5<sup>+</sup> étaient très augmentés au niveau sanguin, suggérant ainsi que les LB circulants chez un patient avec une forte susceptibilité pour les maladies parodontales, pourraient avoir une haute propension à être autoréactifs [294, 297].

En 2009, Donati et al. étudièrent la présence de LB CD5<sup>+</sup> dans les parodontites expérimentales et leur rapport avec les plasmocytes [331, 332]. Ils montrèrent que face au défi bactérien, il y avait une augmentation des LB CD5<sup>+</sup>, et qu'il y avait une corrélation entre les proportions de LB CD5<sup>+</sup> et les proportions de plasmocytes. Ainsi, les LB CD5<sup>+</sup> constituent une part significative de la réponse immunitaire et les plasmocytes peuvent se développer à la fois à partir des LB2 et des LB CD5<sup>+</sup>.

En 2012, Pugliese et al. mirent en avant chez la souris une nouvelle fonction des LB CD5<sup>+</sup>IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>lo</sup> [275]. En effet, les LB1 semblent avoir un rôle chez la souris de promotion de l'ostéoclastogénèse. Initialement, il n'exprime pas RANK à leur surface, mais lorsqu'ils acquièrent une fonction de phagocyte (B1-CDP (B1- Cell Derived Phagocyte)), ils expriment RANK et MCSFR. L'activation combinée par RANKL et MCSF induit une différenciation ostéoclastique des LB1-CDP. Ce mécanisme n'a pas encore été mis en évidence sur les LB1 humains.

#### ***2004 : La circulation des LB a un rôle dans les parodontites***

En 2004, Cindric et al. étudièrent l'expression des molécules d'adhésion, ICAM-1 et  $\beta$ -1 intégrine et la densité des populations de LB et LT dans des biopsies gingivales de deux groupes de patients en fonction de la réponse au traitement parodontal (bonne ou mauvaise) [469]. Aucune différence n'était mise en avant au niveau de l'expression des molécules d'adhésion, ou de la densité capillaire entre les deux groupes, mais ils trouvèrent que ceux qui répondaient bien au traitement étaient caractérisés par un infiltrat prédominant en LT, alors que les LB et LT étaient égaux en nombre chez ceux qui ne répondaient pas au traitement.

Ces résultats n'allaient pas dans le sens d'une expression différente des molécules d'adhésion cellulaire pouvant influencer sur les migrations cellulaires dans les parodontites. Cependant, une susceptibilité plus importante des parodontites a été associée récemment au polymorphisme de I-CAM et V-CAM et à des intégrines [470, 471].

En 2008, Nakajima et al. [281] mirent en évidence le rôle de CXCL13 comme facteur chimiotactique important des LB dans les tissus parodontaux. Le nombre des cellules CXCL13<sup>+</sup> est augmenté dans les parodontites et est associé à des fDCs. Ces deux facteurs jouent un rôle déterminant dans le recrutement et la distribution des LB dans les lésions inflammatoires parodontales.

### ***2017 : LB régulateurs ou B10 dans la parodontite***

Récemment plusieurs auteurs ont étudié le rôle de B10/LBreg, caractérisés par une sécrétion d'IL10 [392, 472-474]. Dai et al. en 2017 étudièrent la production d'IL-10 par les LB CD19<sup>+</sup> dans les tissus gingivaux et les possibles corrélations entre ces cellules et les niveaux d'expression de cytokines proinflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et RANKL) chez des individus avec et sans parodontite chronique. Ils mirent en avant que le niveau d'IL-10 était significativement supérieur dans les tissus gingivaux inflammatoires que dans les tissus gingivaux sains et que la proportion de LB CD19<sup>+</sup> produisant l'IL-10 représentait seulement 1,9% de la population de LB gingivaux [473]. Le taux d'IL-10 était corrélé à la proportion de LB CD19<sup>+</sup>. Les productions d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et de RANKL étaient significativement élevées dans la parodontite et une relation positive entre le niveau de ces cytokines proinflammatoires et le nombre de LB CD19<sup>+</sup> produisant l'IL-10 était également constatée. L'absence d'IL-10 dans les tissus gingivaux sains et sa relation directe avec le taux de cytokines pro-inflammatoires sous-entend que la production d'IL-10 est en réponse à la présence d'autres cytokines. Dans une parodontite, l'inflammation persiste, ce qui suggère que le nombre LB CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> est insuffisant pour inhiber la production des cytokines proinflammatoires.

Ce défaut de régulation est mis en avant Yu et al. et Wang et al. en 2017 [392, 472]. Les LB10 peuvent réguler la réponse inflammatoire dans l'immunité innée, notamment par la voie des TLR. Ces derniers jouent un rôle important dans la médiation de réponses immunitaires liées aux LB, notamment les fonctions régulatrices [475]. Wang et al. ont déterminé les effets de l'activation TLR des LB10 sur la perte osseuse parodontale sur un modèle de parodontite expérimentale [392]. Pour cela, ils isolèrent des LB de la rate de souris "pathogen-free" et les cultivèrent avec du LPS-Pg et/ou du CpG ou seul pendant 48 h pour stimuler la production d'IL-10. Le CpG ou cytidine-phosphate guanine, un agoniste du TLR9,

et le LPS-Pg va interagir avec le TLR4 et orienter le LB vers la sécrétion d'IL-10. Le CpG (cytidine-phosphate guanine) et un agoniste du TLR9 et le LPS-Pg va interagir avec le TLR4 et orienter le LB vers la sécrétion d'IL-10. L'expression et la sécrétion d'IL-10 fut quantifiée respectivement par RT-PCR et ELISA kit : l'IL-10 était fortement stimulée dans le groupe CpG<sup>+</sup>LPS-Pg. Ils déterminèrent également par cytométrie en flux que la proportion de LB CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> était plus importante dans le groupe traité par CpG<sup>+</sup> LPS-Pg, et séparèrent ensuite les LB CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> et les LB CD1d<sup>lo</sup>CD5<sup>-</sup> pour les réaliser un transfert adoptif sur un modèle murin de parodontite expérimentale, créé par ligatures infectées par du Pg. L'analyse par RT-PCR de l'expression d'IL-10 montre que les LB CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> étaient la principale source d'IL-10 après culture avec CpG<sup>+</sup> LPS-Pg.

Après une période d'incubation de 2 semaines, ils euthanasièrent les souris et isolèrent les maxillaires de souris pour mesurer la perte osseuse. La résorption osseuse induite par la ligature infectée par Pg était inhibée dans le groupe transféré avec les LB CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>. Les tissus gingivaux furent isolés également dans les deux groupes et les expressions de RANKL, OPG, IL-10 et TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  analysées par RT-PCR. Le transfert adoptif de LB CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> est responsable d'une diminution du ratio RANKL/OPG et d'une augmentation de la sécrétion d'IL-10. Les expressions de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  se retrouvent également diminuées par le transfert adoptif des LB CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>. Enfin, dans ce groupe, les pourcentages de LB CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, notamment de LB CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> et de de LB CD19<sup>+</sup> fixé au Pg sont augmentés.

Yu et al. en 2017 ont déterminé les effets de l'induction locale des LB10 sur l'inflammation parodontale et la perte osseuse de souris avec une parodontite expérimentale [472]. Pour cela, ils ont récupéré des LB de la rate de souris "pathogen-free" et les ont cultivés en présence de CD40L et de CpG pour induire une sécrétion *in vitro* d'IL-10. CD40L va simuler une activation des CPA par un LT CD4<sup>+</sup> activé et donc permettre l'activation des LB et la production d'IL-10. Ils injectèrent également du CpG et du CD40L dans la gencive d'un modèle murin de parodontite expérimental.

Toutes les souris ont été sacrifiées au bout de 2 semaines et les échantillons (maxillaire et gencives) ont été récupérés. CD40L et CpG stimulèrent la production d'IL-10 par les LB *in vitro*, malgré une diminution du pourcentage de LB CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> et des cellules CD45<sup>+</sup> produisant de l'IL-10. La production d'IL-10 est principalement effectuée par le LB CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>. Ils mesurèrent également la perte osseuse et l'expression gingivale de l'IL-1, du TNF- $\alpha$  et de RANKL. Sous l'influence des LB CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>, la perte osseuse était significativement diminuée et l'expression de RANKL et des cytokines pro-inflammatoires



réduite. Le nombre de cellules multinucléées TRAP<sup>+</sup> le long de la surface alvéolaire était significativement diminué après l'injection dans la gencive de CpG et de CD40L.

Ainsi une induction locale des LB10 peut induire une inhibition de la perte osseuse et de l'inflammation parodontale.

Hu et al. en 2017 isolèrent des LB de rate de souris pathogen-free et les cultivèrent pendant 48 h avec CD40L, IL-21, anti-Tim1, CD40L+IL-21, CD40L+anti-Tim1 ou CD40L+IL-21+anti-Tim1 [474]. Tim1 est une protéine régulatrice, essentielle pour l'induction ou la maintenance de la production d'IL10 par les LB [476].

En parallèle, une parodontite expérimentale par ligature a été réalisée sur les mêmes types de souris, au niveau des deuxième molaires maxillaires pendant 2 semaines, et ils injectèrent les mêmes combinaisons que pour les cultures cellulaires ci-dessus, d'un côté et un vecteur contrôle de l'autre.

Comme pour l'étude de Yu et al. en 2017, ils récupérèrent les maxillaires et la gencive palatine (contrôle et traités) à 2 semaines pour analyser la perte osseuse et la sécrétion d'IL-10. Ils montrèrent que l'expression d'IL-10 sur des cellules cultivées est significativement augmentée en présence de la combinaison CD40L, IL-21 et anti-Tim1, comparée au côté contrôle. Cette combinaison aboutit donc à une diminution de la perte osseuse régulée par les LB10.

Ces 4 articles mettent en avant le rôle régulateur des LB10, qui sont d'ailleurs tous CD5<sup>+</sup>, et leurs effets suppresseurs sur la perte osseuse, qui seraient insuffisants dans les parodontites. Le CD40L confère aux LB la capacité de produire de l'IL-10 tout comme la voie du TLR9, suite à l'action d'un LPS-Pg. Avec l'IL-21 et CD40L, la sécrétion d'IL-10 est augmentée, mais la population de LB10 diminue alors qu'avec un Ac anti-Tim1 et du CD40L, la population de LB10 va augmenter, mais la sécrétion d'IL-10 va rester identique. Il y a donc une régulation de l'expression d'IL-10 et du nombre de LB10 en fonction de l'environnement cytokinique.

Ainsi l'étude de la littérature sur les LB dans les maladies parodontales a mis en avant les rôles protecteurs et destructeurs des LB tels que Zouali et al. les avait décrits partiellement dans leur revue générale en 2017 [34] :

- **Des rôles protecteurs** par :
  - La libération d'Ig spécifiques qui vont protéger l'organisme et faciliter la clairance bactérienne

- La promotion de l'inflammation lorsqu'elle est contrôlée pour répondre efficacement au défi bactérien
- La participation à la réponse innée par le LB1, qui permet d'être une première ligne de défense face aux pathogènes, et
- Lorsque les réactions auto-immunes restent physiologiques pour assurer la première ligne de défense ou l'élimination des débris tissulaires
- La régulation de l'inflammation et de la perte osseuse via l'action des LB10
- **Des rôles destructeurs par :**
  - La promotion de l'ostéoclastogénèse directement ou en activant le LT vers l'expression des SOFAT (Secondary Ostéoclastogenic factor of Activator of T cells) [477]
  - Les plasmocytes, leur maintien (BAFF, APRIL) et leurs sécrétions (sRANKL, MMPs, cytokines proinflammatoires), mais également leur Ig (manque d'affinité, complexes immuns proinflammatoires, réactivités croisés)
  - La promotion de l'inflammation lorsqu'elle n'est plus contrôlée
  - Les phénomènes auto-immuns lorsqu'ils ne sont plus contrôlés

## IV Auto-immunité dans les maladies parodontales

### 1- Immunité et auto-immunité

Pendant longtemps, la réponse immunitaire était considérée comme ayant pour fonction principale la distinction du soi et du non-soi, alors qu'elle est un système hautement régulé qui a pour but d'éliminer des pathogènes. Le modèle du danger a été développé par P. Matzinger en 1994 [478] et met en avant que le système immunitaire est provoqué par tout agent susceptible d'entraîner des destructions tissulaires nécrotiques et inflammatoires. Ce n'est donc pas le caractère étranger qui déclenche la réponse immunitaire, mais sa capacité à provoquer une mort cellulaire anormale. Les cellules dans les tissus renouvelés meurent par apoptose, sans signaux de détresse, alors que les cellules dans les tissus nécrotiques sont à l'origine de signaux de danger qui sont captés par les CPA quiescentes, par leurs PPRs (Pattern Recognition Receptor). Les cellules apoptotiques sont en effet éliminées par phagocytose et ne peuvent pas libérer leurs signaux de danger. Plusieurs causes peuvent induire une mort cellulaire anormale (blessure, cancer, toxique, traumatisme, brûlure, pathogène) et le déversement de DAMP (Damage Associated Pattern Molecules) et de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) qui vont interagir avec les PPRs. Les PAMP sont ainsi des motifs moléculaires produits par des microorganismes, mais pas par l'organisme, comme les LPS bactériens. Les PPRs au niveau de CPA sont principalement représentés par les TLR.

Les tissus normaux sont donc capables d'induire une réponse immunitaire suite à l'activation des CPA par les PAMP et les DAMP, de déclencher la réponse adaptative et de l'orienter par la production de cytokines et de chémokines. Ils possèdent une fonction tolérogène ; ils présentent leurs propres composants, mais sont incapables de délivrer un signal de co-stimulation (B7, CD40...) rendant l'activation des LT et LB impossible (ils entrent en apoptose ou en anergie).

L'auto-immunité résulte ainsi d'une perte de la tolérance du soi suivant divers mécanismes [338]. La tolérance est un phénomène central ou périphérique continu caractérisé par la délétion, l'anergie ou la rétention des éléments autoréactifs.

La tolérance centrale est principalement modulée par l'interaction Fas/Fas-ligand (CD95/CD95L) qui induit l'apoptose cellulaire et une perturbation de ce système peut être par exemple à l'origine des LT autoréactifs, et d'une auto-immunité systémique [479].

La tolérance périphérique a lieu dans les OLS et dans les sites d'inflammation, et passe notamment par des processus d'anergie ou de délétion. L'anergie amène à une

désactivation des clones auto réactifs, tout en les gardant vivants. Elle intervient quand le signal de costimulation avec la CPA présentant un Ag du soi est insuffisant [480]. La cellule pourra être réactivée par la suite. La délétion clonale et l'arrêt des réponses auto-immunes est également assurée par les LTregs CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup>. Une inhibition de la régulation peut être donc à l'origine de mécanismes auto-immuns, et le biofilm dysbiotique peut induire ces mécanismes en agissant sur les DCs gingivaux (Chapitre II.3)[245, 481-483].

Les fonctions tolérogènes des tissus périphériques évoluent en fonction de l'inflammation, de l'âge, des facteurs génétiques et épigénétiques [484]. La rupture de la tolérance est favorisée par un contexte infectieux ou inflammatoire et les DCs activent également les lymphocytes de faible affinité, d'autant plus si ces DCs sont également stimulées par un signal TLR.

## **2- Mécanismes auto-immuns dans les maladies parodontales**

L'auto-immunité des maladies parodontales est discutée depuis 1965 [462]. De nombreuses études ont mis en évidence des auto-anticorps contre des composants de l'hôte dans la parodontite, notamment les collagènes, l'ADN ou des IgG agrégées [338]. L'auto-immunité est un composant particulier des maladies parodontales et la présence de mécanismes auto-immuns influe sur la progression de la parodontite [305], et pourrait avoir un rôle particulier dans les parodontites agressives et être un des liens avec certaines pathologies systémiques comme le diabète de Type I ou l'athérosclérose [338, 485, 486].

Divers mécanismes de l'auto-immunité dans les maladies parodontales sont suspectés et font intervenir l'ensemble des acteurs de l'inflammation [338] :

- **augmentation de la présentation des auto-antigènes à travers l'augmentation des IgA** : Les IgA sécrétoires fixent les pathogènes aux cellules épithéliales et les présentent aux DCs. Une augmentation des dépôts d'IgA peut être à l'origine de maladies auto-immunes (maladie cœliaque, néphropathies à IgA) et être un mécanisme déclencheur de l'auto-immunité. Les IgA sont décrites comme étant augmentées dans les parodontites [414, 487].
- **altération des fonctions des LT CD4<sup>+</sup> ou des LT CD8<sup>+</sup>** : le biofilm dysbiotique peut influencer l'activation et l'orientation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Une réduction de la population LT en parallèle d'une augmentation de la population LB et une diminution de la régulation favorisent le maintien des LB autoréactifs [338]
- **présentation des auto-antigènes et activation des LT autoréactifs** : les Dcs, les Mo, et les LB sont les cellules présentant l'Ag associé avec le CMH-II. Elles

permettent l'activation ou le déclenchement de l'apoptose ou l'anergie des LT naïfs en fonction de la présence ou de l'absence de signaux de co-stimulation. Dans des conditions inflammatoires, notamment sous l'influence de l'IFN- $\gamma$ , le CMH-II peut être également exprimé par les cellules épithéliales, les PN et les cellules endothéliales et surexprimé sur les LB [338, 341, 488-492]. Ce mécanisme permet de limiter les LT autoréactifs qui vont réagir avec le CMH-II, sans facteurs de co-stimulation. Le CMH-II par les tissus parodontaux est particulièrement augmenté avec l'âge dans les gencives saines, par rapport au CMH-I, mais il semble diminué dans les parodontites [490], favorisant ainsi l'accumulation de LT autoréactifs.

- **activation polyclonale des LB et production d'auto-anticorps** : les Ac naturels sont responsables d'une auto-immunité physiologique en l'absence de pathologie. Les LB1 sont décrits comme étant les principaux producteurs d'Ac naturels et sont considérés comme autoréactifs. Leur nombre a été décrit comme étant important dans les parodontites [297], mais leur phénotype a été revu depuis [314, 324]. Ils répondent à certains composants du soi altéré (DAMPS) et ainsi qu'à des structures pathogènes très conservées.

- **idiosyncrasie du réseau antigénique idiotypique de Jerne** : les immunoglobulines portent des marqueurs idiotypiques au niveau de leurs parties variables. L'ensemble des idiotypes forme un idiotope qui peut être potentiellement reconnu par des Ac, du fait de son motif moléculaire particulier. Des anticorps anti-idiotype sont donc produits et sont eux même à l'origine d'une production d'anticorps anti-anti-idiotype conduisant à un réseau ouvert permettant le maintien de l'activation des LB et des LT naïfs et une régulation du système immunitaire en l'absence d'Ag. Aucune étude n'a mis en évidence un rôle de ce mécanisme dans les maladies parodontales [338, 493].

- **réactivité croisée bactéries /virus/auto-antigènes** : les bactéries et l'hôte peuvent partager des motifs moléculaires communs sur certaines protéines, comme la HSP60 (Heat Shock Protein) qui est un facteur de régulation de la régénération tissulaire. *Aa* et le *Pg* produisent une HSP60 à l'origine d'une immunogénicité, et la production d'Ac capables de se fixer aussi bien sur la protéine humaine que sur la protéine bactérienne [486, 494, 495]. L'HSP60 est un facteur de virulence de *Aa* et *Pg*, mais elle a également un rôle dans la régénération osseuse [496]. Par ce mécanisme, une résorption osseuse est associée à la fixation d'auto-anticorps anti-HSP60. Par ailleurs, des épitopes communs entre oxDLD (Oxided low density lipoprotein), qui a un rôle dans la pathogénie de l'athérosclérose et HSP60 du *Aa* ont été caractérisés, induisant ainsi une réaction croisée avec une nIgM qui interagit à la fois avec les HSP60 du *Aa*

et l'oxDLA humaine. [494, 497]. Ce mécanisme constitue un des éléments expliquant l'association entre parodontite et athérosclérose [486].

- **production des ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Auto-antibodies)** : les ANCA sont des anticorps dirigés contre les antigènes du cytoplasme des PN et sont retrouvés dans de nombreuses pathologies auto-immunes, comme la PR ou le SLE [338]. Ces pathologies sont associées aux parodontites et il pourrait y avoir un lien entre ces pathologies par l'action des ANCA, qui sont également décrit suite à l'exposition aux pathogènes parodontaux [498]. Les ANCA dans les parodontites sont de deux origines : l'activation des PN par le TNF- $\alpha$  ou par les LB autoréactifs, directement activés par les Super-Ag des pathogènes parodontaux peut aboutir à une dégranulation du PN et à la libération d'enzymes qui peuvent à leur tour déclencher la production d'ANCA. Les ANCA sont responsables d'une apoptose retardée et d'une augmentation de la perméabilité endothéliale, ce qui peut expliquer l'augmentation de la durée de vie de PN dans les parodontites et faciliter l'arrivée des cellules inflammatoires.

- **modifications de la régulation par les cellules NK** : les réponses immunitaires anti-colagène-1 et anti-HSP60 sont contrôlées par les cellules NK [499]. Leur présence est augmentée dans les parodontites et elles produisent rapidement de nombreuses cytokines qui vont influencer la réponse des LT auxiliaires et maintenir l'homéostasie tissulaire.

- **facteurs génétiques prédisposant** : le polymorphisme des constituants du CMH peut être un facteur favorisant la mise en place des maladies auto-immunes. Dans les parodontites, les études sont contradictoires sur une prédisposition liée au HLA [338, 493, 500, 501]

L'auto-immunité est donc un composant de l'étiopathogénie des maladies parodontales où les LB, notamment les LB autoréactifs ont un rôle majeur. La production d'auto-anticorps naturels a un rôle physiologique et protecteur d'aide à la détersion, mais une hyperproduction suite à des signaux perçus par les TLR peut être pathologique. De plus, les auto-anticorps issus des réactions croisées semblent avoir un potentiel destructeur important dans les parodontites. Le polymorphisme du CMH a probablement un rôle dans la facilitation des réactions auto-immunes, notamment dans certains types de parodontites

L'étiopathogénie des maladies parodontales met en avant de multiples interactions entre le biofilm, les cellules immunitaires, l'environnement stromal. Le LB apparaît comme

un élément central dans ces mécanismes et il semble orchestrer l'ensemble de la réponse adaptative [272].

Il nous a donc paru nécessaire de nous intéresser plus particulièrement au LB, d'autant plus que des répercussions systémiques au niveau des LT avaient été rapportées [238, 251], présentant ainsi la parodontite également comme une maladie systémique.

## V Objectifs de la thèse

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, de nombreux acteurs cellulaires participent à l'étiopathogénie des maladies parodontales, face à un biofilm dysbiotique. Nous avons pu constater que la réponse immunitaire était extrêmement régulée. L'action subversive des pathogènes parodontaux, notamment le *Pg*, manipule la réponse immunitaire et aboutit à la mise en place d'une hyperinflammation et de destructions tissulaires.

Les LB apparaissent comme prépondérants au niveau des lésions parodontales, notamment sous leurs formes terminales de maturation (plasmocytes). Ils orchestrent la réponse adaptative à travers une coopération étroite avec les LT et le complément, sous l'influence de l'environnement cytokinique et des facteurs de virulence bactériens.

L'ensemble de ces signaux cumulés va définir l'orientation de la réponse immuno-inflammatoire et son organisation. Les LB participent à la constitution de l'environnement cytokinique, et nous avons vu qu'ils étaient grandement responsables à la fois de la destruction de matrice extracellulaire, des réactions auto-immunes au sein des tissus parodontaux, mais surtout ce sont les principaux inducteurs de la perte osseuse dans les atteintes parodontales.

Le rôle central des LB a été démontré par différentes études animales, où une altération des fonctions ou une déplétion des LB amène à une diminution de la perte osseuse après induction d'une parodontite expérimentale.

Les immunothérapies sont des thérapeutiques qui permettent de modifier une réponse immunitaire. Elles sont de plus en plus utilisées pour le traitement des maladies auto-immunes et des cancers. Un des premiers objectifs de ce travail a été de déterminer les implications des immunothérapies en odontostomatologie, mais également les effets de différentes immunothérapies, ciblant directement ou indirectement les LB sur l'état parodontal des patients. Aucun consensus sur la prise en charge des patients en odontologie n'est à ce stade encore déterminé entre les médecins prescripteurs et les odontologues et stomatologues. Ce questionnement a été l'objet de notre 1<sup>er</sup> article.

Nous avons donc réalisé une revue de la littérature sur les conséquences odontostomatologiques de l'utilisation des immunothérapies et les précautions à prendre selon les recommandations professionnelles. Ce sujet est en perpétuelle évolution car de nouveaux traitements sortent régulièrement sur le marché. Dernièrement, le Keytruda®, du



pembrolizumab, un anti-PD-1, une protéine exprimée sur les surfaces des cellules cancéreuses, mais qui est également à la surface des LB, a obtenu une prise en charge par la sécurité sociale dans le cadre du traitement de certains cancers du poumon. Le PD-1 a notamment un rôle régulateur de l'activation des LB naïfs [502] et nous pourrions nous demander quels seraient ses effets à la fois sur une éventuelle parodontite, mais également sur les précautions à prendre chez ces patients sous ce type de traitement dans leur prise en charge bucco-dentaire.

Nous avons également étudié l'effet de deux immunothérapies sur le parodonte : l'effet d'un anti-CD20, à l'origine d'une déplétion en LB et d'un anti-IL-6R, bloquant les effets de l'IL-6. L'IL-6 est notamment une cytokine importante dans l'induction de la voie plasmocytaire chez les LB matures. L'utilisation d'anti-TNF- $\alpha$  dans la PR, avait déjà montré une amélioration de l'état parodontal [39, 40]. Ces études sont l'objet des articles 3 et 4.

Les résultats de ces deux études nous ont encouragés à poursuivre notre intérêt pour le rôle des LB dans les maladies parodontales. Nous avons précédemment vu que les LB représentaient une population hétérogène avec diverses fonctionnalités à l'origine de rôles destructeurs et protecteurs dans les parodontites. Le dernier objectif de ce travail a été de déterminer les phénotypes des LB sanguins et gingivaux dans les parodontites. Pour cela nous avons mis en place une biocollection de tissus humains et une étude pilote sur des parodontites sévères afin de déterminer les caractéristiques des LB dans les gencives et le sang des patients, en fonction de leur état parodontal.

Une meilleure connaissance du rôle des différentes sous-populations de LB permettra d'affiner le diagnostic des patients, mais également de trouver de nouvelles voies thérapeutiques à l'avenir, utiles chez certains patients ne répondant pas de manière adaptée aux traitements conventionnels.

## ARTICLES

## **Article 1 : Prise en charge des patients sous immunothérapie. (publié)**

Les immunothérapies ou biothérapies sont de plus en plus utilisées dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques résistantes aux traitements conventionnels. De nombreuses molécules sortent régulièrement des laboratoires pharmaceutiques et sont testées dans des essais cliniques avant d'être mises sur le marché.

L'objectif de l'immunothérapie est de modifier les mécanismes immunitaires en les stimulant (immunostimulation), en les modulant (immunomodulation) ou en jugulant l'immunité (immunosuppression), quand la réponse immune est excessive ou encore non souhaitable.

Ces biothérapies vont agir sur des processus du système immunitaire en les modulant et peuvent être responsables de nombreux effets secondaires, notamment infectieux. Ces complications infectieuses peuvent être d'ordre général, ou local. Les actes dentaires peuvent être potentiellement inducteurs d'une bactériémie, qui chez les patients sous immunothérapies peut représenter induire des infections, ce qui impose des précautions à prendre dans la prise en charge de ces patients à risque.

Les biothérapies sont assez méconnues par les odontologues qui vont de plus en plus être amenés à prendre en charge des patients traités par ces molécules. Actuellement, aucun consensus n'existe. L'objectif de cet article est donc de faire le point sur les recommandations en odontologie qui pourraient s'appliquer aux immunothérapies et celles recommandées par les spécialités qui les utilisent, notamment en rhumatologie.



ELSEVIER  
MASSON

Reçu le :  
14 septembre 2013  
Accepté le :  
20 mars 2014  
Disponible en ligne  
3 mai 2014



CrossMark

Mise au point

## Prise en charge des patients sous anticorps thérapeutiques en odontostomatologie

Managing patients with therapeutic antibodies in odontostomatology

J. Demoersman<sup>a</sup>, A. Soueidan<sup>b,\*</sup>, P. Corre<sup>c</sup>, J.O. Pers<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Département de parodontologie, faculté de chirurgie dentaire, 22, avenue Camille-Desmoulins, BP 815, 29285 Brest cedex, France

<sup>b</sup> Département de parodontologie, UIC odontologie, LIOAD U 791, CHU de Nantes, 1, place Alexis-Ricordeau, BP 84215, 44042 Nantes cedex 1, France

<sup>c</sup> Service de stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale, 1, place Alexis-Ricordeau, 44093 Nantes cedex 1, France

<sup>d</sup> EA 2216, immunologie, pathologie et immunothérapie, CHU Morvan, BP 824, 29609 Brest cedex, France

Disponible en ligne sur

**ScienceDirect**

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

### Summary

Immunotherapies, particularly therapeutic antibodies, are increasingly used in the treatment of many autoimmune or oncological diseases. Patients treated with therapeutic antibodies may present with an increased risk of infection or of osteonecrosis of the jaws (ONJ). There is currently no consensus on the management of patients treated with therapeutic antibodies. These treatments are mainly used in hospitals, but they have been increasingly prescribed in ambulatory treatment for patients undergoing oral care. It is therefore important to establish therapeutic precautions for these patients. We had for aim to describe these antibody therapies, their indications, their potentially adverse effects in the oral cavity and to review the latest recommendations.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Immunotherapy, Dentistry, Guidelines

### Résumé

Les immunothérapies, notamment les anticorps thérapeutiques, sont de plus en plus utilisées dans de nombreuses maladies auto-immunes ou cancéreuses. Des manifestations buccales, une majoration du risque infectieux ou l'apparition d'ostéonécroses des mâchoires peuvent être liées à ce type de traitement. Il n'existe actuellement pas de consensus concernant les patients traités par anticorps thérapeutiques. Si ces traitements sont majoritairement utilisés en milieu hospitalier, ils sont de plus en plus souvent prescrits en ambulatoire chez des patients suivis pour des soins buccodentaires. Il apparaît donc important d'instaurer certaines précautions thérapeutiques. Le but de cette mise au point est de présenter ces anticorps thérapeutiques, leurs indications, leurs effets secondaires potentiels au niveau de la cavité buccale, avant de faire une synthèse des différentes recommandations actuelles.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Immunothérapie, Dentisterie, Recommandations

### Introduction

Le système immunitaire joue un rôle de protection de l'organisme vis-à-vis des pathogènes et élimine les substances

toxiques et allergiques qui pénètrent à travers les surfaces muqueuses [1]. L'immunité peut être de type innée ou adaptative [1].

Plusieurs types de dysfonctionnement du système immunitaire sont décrits : une hyperréaction à certains antigènes (phénomènes d'hypersensibilité ou allergies), une hyporéaction face à un pathogène responsable d'une maladie

\* Auteur correspondant.  
e-mail : [assem.soueidan@univ-nantes.fr](mailto:assem.soueidan@univ-nantes.fr) (A. Soueidan).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.revsto.2014.03.004> Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale 2014;115:152-163  
2213-6533/© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

infectieuse, ou encore une inadaptation responsable d'une maladie auto-immune (LEEM, 2011).

L'objectif de l'immunothérapie est de réguler les mécanismes immunitaires en les stimulant (immunostimulation), en les modulant (immunomodulation) ou en jugulant la réponse immunitaire (immunosuppression) mais avec augmentation du risque infectieux [2,3].

L'objectif de ce travail est de faire le point sur les différents types d'immunothérapies utilisant les anticorps thérapeutiques (AT) et de déterminer leurs retentissements au niveau buccodentaire. Nous avons réalisé une recherche sur Medline avec les mots clés *oral/buccal manifestations* et le nom des différents anticorps de 2008 à 2013, ainsi qu'une recherche manuelle sur les caractéristiques des médicaments suivant l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) et les recommandations éditées par différentes sociétés savantes.

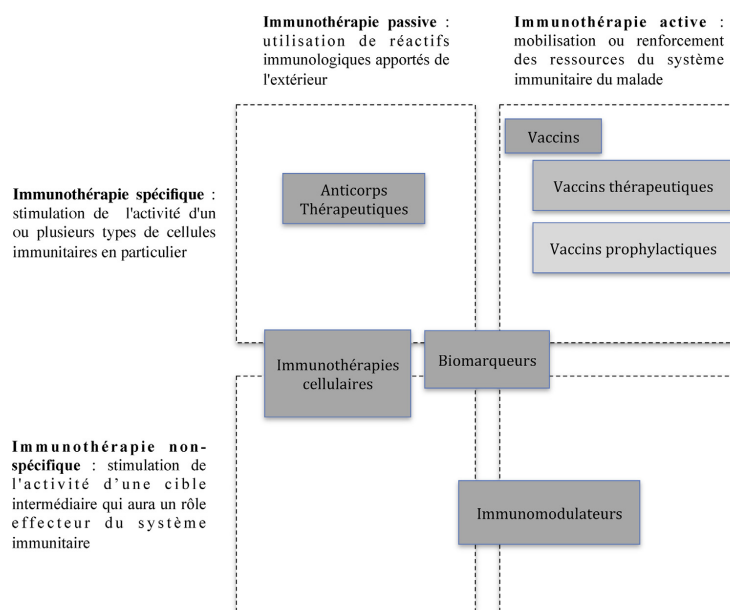
### Les immunothérapies par anticorps thérapeutiques

Les immunothérapies (ou biothérapies) peuvent être actives ou passives, spécifiques ou non spécifiques (fig. 1). Cinq domaines sont répertoriés : les AT, les immunothérapies cellulaires (utilisation de cellules immunitaires humaines, modifiées ou non, voire de cellules souches humaines), les

vaccins (thérapeutiques ou prophylactiques), les immunomodulateurs (cytokines, peptides, ARN, ADN d'origine humaine, bactérienne ou fongique et les corticoïdes) et les biomarqueurs (fig. 1) (LEEM, 2011).

Nous nous limiterons aux AT.

Les AT sont issus de technologies utilisant des anticorps entiers ou des fragments d'anticorps dirigés contre des cibles solubles, membranaires ou intracellulaires. Ils sont caractéristiques d'une immunothérapie spécifique et passive (fig. 1). La production d'anticorps monoclonaux est connue depuis 1975, avec les travaux sur les hybridomes. Les premiers anticorps, d'origine murine, étaient peu efficaces et fortement immunogènes (production par le patient d'anticorps anti-souris). Ces anticorps ont été progressivement humanisés (chimérique homme-souris ; 1984, humanisé, 1988 ; humain, 1994) [4]. La dénomination des anticorps thérapeutiques a suivi une nomenclature précise : suffixe MAB pour « *monoclonal antibody* », précédé de MO pour les anticorps murins, XI pour les anticorps chimériques homme-souris, ZU pour les anticorps humanisés et MU pour les anticorps entièrement humains (fig. 2). Le premier anticorps monoclonal, le muromomab (anti-CD3), a été testé en 1981 dans le traitement des épisodes de rejet aigu des transplantations rénales. Dès 1989, un anti-TNF- $\alpha$ , l'infliximab (Rémicade®) a été utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (tableau I).



**Figure 1.** Différents types d'immunothérapies et domaines thérapeutiques. D'après LEEM, 2011.

Author's personal copy

J. Demoersman et al.

Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale 2014;115:152-163

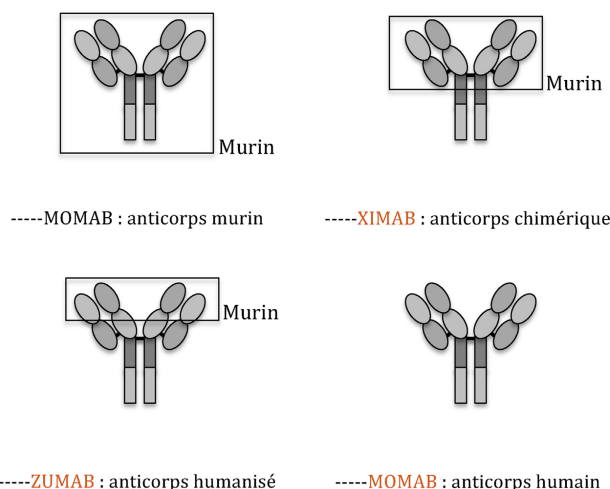


Figure 2. Constitution des anticorps thérapeutiques et nomenclature.

Les AT sont généralement administrés par voie intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée, mais également par voie sublinguale, plus accessible [5]. Ils ont initialement été utilisés en cancérologie, dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires et dans la prévention des rejets de greffe [3,6,7]. Actuellement, leur utilisation s'étend vers les pathologies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, l'ostéoporose, les allergies et certaines infections virales ... [5,8].

Plus de 41 anticorps monoclonaux thérapeutiques sont aujourd'hui sur le marché et des dizaines sont en cours d'élaboration et d'évaluation. Ces anticorps sont classés en fonction de leur cible d'action (tableau I).

Les AT peuvent être conjugués (anticorps armés) à un isotope radio-actif (radio-immunothérapie), à une toxine (immunotoxines), à un médicament ou à une enzyme et servir de vecteur permettant une délivrance ciblée des molécules directement sur le site d'action (irradiation ciblée d'une tumeur, internalisation d'une toxine au niveau des cellules cibles, *antibody directed enzyme prodrug therapy* ou *abzymes* (ADEPT) [7]. Ils peuvent également être bispécifiques en présentant deux régions variables Fab' de spécificité différente pour relier 2 molécules cibles distinctes, avoir des cibles intracellulaires (*intrabodies*), ou n'être que des fragments d'anticorps recombinants, produits par la technique du « *phage display* » [7]. Le champ d'utilisation des immunothérapies concerne le traitement de l'allergie, des cancers, des maladies auto-immunes, neurodégénératives, virales et la prévention du rejet de l'organe greffé et des réactions de *graft versus host* (GVH) (tableau I).

Des mécanismes d'immunotolérance facilitent le développement des tumeurs cancéreuses. L'immunothérapie est la 4<sup>e</sup>

modalité de traitement des cancers (avec la radiothérapie, la chimiothérapie et le traitement chirurgical). Depuis quelques années, un concept de surveillance immunologique est étudié ; le système immunitaire (inné ou adaptatif) pourrait prévenir l'apparition des tumeurs et limiter leur croissance [9]. L'utilisation d'AT a été initialement proposée pour le traitement du mélanome et du cancer du sein (LEEM, 2011). Ils sont aussi utilisés en complément d'autres types d'immunothérapies (IL-2, interférons).

L'autre grand domaine d'utilisation des AT est le traitement des pathologies auto-immunes comme la sclérose en plaques, la maladie de Crohn, le diabète de type I et la polyarthrite rhumatoïde. Ces deux dernières pathologies présentent par ailleurs des rapports étroits avec les maladies parodontales [10], pathologies inflammatoires d'origine infectieuse où des mécanismes de type auto-immun sont soupçonnés être des régulateurs des destructions tissulaires et de la progression de la maladie [11].

Des AT ont également été mis au point pour neutraliser le virus syncytial respiratoire responsable d'infections respiratoires basses chez les prématurés et les jeunes enfants présentant une cardiopathie congénitale ou une dysplasie broncho-pulmonaire (ANSM, 2013).

## Conséquences buccodentaires des immunothérapies

Les AT peuvent être responsables d'affections hépatiques, cardiaques, rénales, de troubles sanguins (thrombocytopénie, pancytopenie, neutropénie) et neurologiques potentiellement mortels, et de réactivations virales (hépatite B) et bactériennes

Author's personal copy

**Tableau I**  
**Principaux anticorps thérapeutiques utilisés en immunothérapie.**

| DCI                  | Nom commercial           | Cible                                 | Domaine d'utilisation  | Effets/mécanismes d'action  | Effets indésirables généraux pouvant influencer sur la prise en charge dentaire | Effets indésirables oro-faciaux  |
|----------------------|--------------------------|---------------------------------------|--|---|---|--|
| Éculizumab           | Soliris®                 | C5                                    | Hémoglobinurie paroxysmique nocturne, syndrome hémolytique et urémique atypique                            | Inhibition de la voie terminale du complément. Réduction de l'activité hémolytique induite par le complément  | Infections  | Rien de signalé  |
| Ipilimumab           | Yervoy®                  | CD152/CTLA4                           | Mélanome   | Blocage des CTLA-4 (régulateur négatif) et maintien de la réponse immunitaire active (cellules T) contre les cellules cancéreuses   | Neuropathies sensitives ou motrices, infections                                 | Rien de signalé  |
| Bélimumab            | Benlysta®, LymphoStat-B® | BAFF                                  | Lupus systémique actif, polyarthrite rhumatoïde  | Liaison à la protéine soluble Bly5 (BAFF) à blocage de son interaction avec des récepteurs membranaires des lymphocytes B. Inhibition de la survie des lymphocytes B, notamment les lymphocytes B auto-réactifs et diminution de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines                         | Réactivation hépatite B ou C, cancer, infections                                | Rien de signalé  |
| Ofatumumab           | Arzerra®                 | CD20                                  | Leucémie lymphoïde chronique   | Liaison au CD20 à la surface des lymphocytes B. Recrutement et activation du complément à la surface cellulaire aboutissant à la lyse des cellules tumorales. Recrutement de cellules <i>natural killer</i> (NK) et induction de la mort cellulaire par l'intermédiaire de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps | Réactivation hépatite B, arythmies cardiaques graves, infections                | Rien de signalé  |
| Rituximab            | MabThera, Rituxan®       | CD20                                  | Lymphome non hodgkinien, leucémie lymphoïde chronique, polyarthrite rhumatoïde                             | Fixation spécifique à CD20 à la surface des lymphocytes pré-B et B mature. Induction d'une mort cellulaire programmée par apoptose  | Infections, troubles de la coagulation, hyperglycémie, troubles neurologiques   | Paralysie faciale (rare), réactions cutanées bulleuses sévères, nécro-épidermolyse bulleuse aigüe (très rares) |
| Ibritumomab tiuxétan | Zévalin®                 | CD20                                  | Lymphome non hodgkinien, souvent associé au rituximab, lymphome folliculaire (traitement de consolidation) | Liaison au CD20 membranaire des lymphocytes pré-B et B mature. L'isotope yttrium-90 fixé à l'anticorps monoclonaal permet de détruire la cellule cible et les cellules voisines   | Infections, pétéchie, hémorragies   | Candidose buccale, réactions cutanéo-muqueuses (syndrome de Steven Johnson)                                    |
| Basiliximab          | Simulect®                | CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) | Prévention des rejets aigus de greffes rénales allogéniques  | Fixation à l'antigène CD25 du récepteur à l'interleukine 2 situé à la surface des lymphocytes T en réponse à une stimulation antigénique. Bloque la lésion du récepteur avec l'interleukine 2 (IL-2R) et stoppe la prolifération des lymphocytes T pendant le temps de présence du basiliximab  | Risque accru d'hypersensibilité, cancers, infections                            | Rares cas de Lichen Plan   |

Prise en charge des patients sous anticorps thérapeutiques en odontostomatologie

Author's personal copy

156

**Tableau I (Suite)**

| DCI           | Nom commercial   | Cible                      | Domaine d'utilisation  | Effets/mécanismes d'action  | Effets indésirables généraux pouvant influencer sur la prise en charge dentaire  | Effets indésirables oro-faciaux   |
|---------------|------------------|----------------------------|--|---|--|---|
| Muromonab-CD3 | Orthoclone OKT3® | CD3                        | Prévention du rejet aigu des organes transplantés  | Liaison au récepteur du complexe CD3-cellule T aboutissant au à l'activation, puis au blocage et à l'apoptose des lymphocytes T   | Infections (fongiques), cancer, tremblements musculaires, paralysie du VI  | Rien de signalé   |
| Abciximab     | ReoPro®          | CD41 (intégrine alpha-IIb) | Inhibition de l'agrégation plaquettaire, angioplastie  | Inhibition de l'agrégation plaquettaire   | Hémorragies, troubles cardiaques, thrombocytopénie   | Rien de signalé   |
| Bésilesomab   | Scintimun®       | NCA-95, ACE                | Lésions inflammatoire et métastases osseuses (détection par scyntagrapie)                              | Fixation au NCA-95 (non-spécifique cross-reacting antigen 95) exprimé sur la membrane cellulaire des granulocytes et de leurs précurseurs. Réaction croisée avec les tumeurs exprimant l'antigène carcino-embryonnaire (ACE). Associé à un radio-élément, le technétium (99mTc) pour les cellules porteuses des ces antigènes   | Hypotension, réactions anaphylactiques (œdème de Quincke), immunogénicité  | Rien de signalé   |
| Cétuximab     | Erbix®           | EGFR                       | Cancer colorectal métastatique et cancers de la tête et du cou   | Fixation non définitive au facteur de croissance épidermique (EGFR) et blocage de la fixation des ligands endogènes de l'EGFR. Inhibition de la fonction du récepteur. Recrutement des cellules immunes effectrices cytolytiques contre les cellules tumorales exprimant l'EGFR   | Troubles cardio-vasculaires, affections oculaires. Risque d'infection à <i>S. aureus</i> (cellulites, érysipèle, épidermolyse staphylococcique, sepsis avec risque d'issue fatale) | Rien de signalé   |
| Panitumumab   | Vectibix®        | EGFR                       | Cancer colorectal métastatique (CCRM) exprimant le gène KRAS non muté                                  | Liaison au récepteur de l'EGFR favorisant le développement cellulaire des tissus épithéliaux et exprimés par des cellules tumorales épithéliales. Internalisation du récepteur, inhibition du développement cellulaire, induction d'une apoptose, diminution de la production d'IL-8 et du facteur de croissance endothélial vasculaire (EGF)   | Insuffisance rénale aiguë, hémorragies, infections, dermite acnéique   | Sécheresse buccale, stomatite aphteuse, chéilite, gerçures des lèvres, alopecie |
| Catumaxomab   | Rémovab®         | EpCAM, CD3                 | Traitement intrapéritonéal de l'ascite maligne chez les patients atteints de carcinomes EpCAM-positifs | Interactions avec la molécule d'adhésion cellulaire épithéliale (EpCAM), l'antigène CD3 (lymphocytes T mature) et récepteur Fcγ (cellules immunitaires accessoires). Rapprochement sur le site des cellules immunitaires accessoires, des lymphocytes T et des cellules tumorales. Mise en place d'une réaction immunologique concertée contre les cellules tumorales (activation des lymphocytes T, cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps [ADCC], cytotoxicité dépendant du complément [CDC] et phagocytose) aboutissant à leur lyse | Infections   | Rien de signalé   |

J. Demoin et al.

Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale 2014;115:152-163



Author's personal copy

Tableau I (Suite)

| DCI                   | Nom commercial         | Cible                                      | Domaine d'utilisation  | Effets/mécanismes d'action   | Effets indésirables généraux pouvant influencer sur la prise en charge dentaire | Effets indésirables oro-faciaux   |
|-----------------------|------------------------|--|--|--|---|---|
| Palivizumab           | Synagis®, Abbosynagis® | Protéine F du virus respiratoire syncytial | Virus respiratoire syncytial (prévention)  | Épitope du site antigénique A de la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (VRS). Neutralisation et inhibition de la fusion des virus  | Infections virales (peu fréquent)   | Rien de signalé   |
| Trastuzumab           | Herceptin®             | HER2/neu                                   | Cancer du sein métastatique HER2+, cancer gastrique métastatique HER2+   | Action contre le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2), surexprimé dans les cancers primitifs du sein. Inhibition de la prolifération des cellules tumorales humaines qui surexpriment HER2<br>Puissant médiateur de la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC), notamment sur les cellules tumorales HER2+ | Rhino-pharyngite, sinusite, infection cutanée, rhinite                          | Sécheresse buccale, inflammation des muqueuses                              |
| Omalizumab            | Xolair®                | Région Fc de IgE                           | Asthme allergique  | Fixation aux IgE et inhibition de la liaison IgE aux FcεR1 (récepteurs de haute affinité des IgE), réduisant ainsi la quantité d'IgE circulantes pouvant déclencher la chaîne de réactions allergiques. Diminution des récepteurs FcεR1 des basophiles par rétrocontrôle. Réduction de la production d'histamine                                 |   | Rien de signalé   |
| Canakinumab           | Ilaris®                | IL-1β                                      | Syndrome de Muckle-Wells (MWS), syndrome chronique infantile neurologique, cutané et articulaire (CINCA), maladie systémique inflammatoire à début néo-natal (NOMID), formes sévères du syndrome familial auto-inflammatoire au froid (FCAS) ou urticaire familiale au froid (FCU) | Fixation à l'IL-1β et neutralisation de son activité biologique via ses récepteurs (activation génique induite par l'IL-1 bêta et synthèse de médiateurs inflammatoires)   | Infections graves, rhino-pharyngite, cancers                                    | Rien de signalé   |
| Ustékinumab           | Stelara®               | IL-12, IL-23                               | Scléroses multiples, psoriasis, psoriasis arthritique  | Blocage de la fixation de IL-12 et IL-23 à leurs récepteurs IL-12Rβ1 exprimé à la surface de cellules immunitaires. Inhibition de l'activation des cellules natural killer (NK) et de la différenciation et l'activation des lymphocytes T CD4+  | Infections, cancers   | Rien de signalé   |
| Atlizumab/tocilizumab | Actemra®, RoActemra®   | Récepteur de IL-6                          | Polyarthrite rhumatoïde  | Immunosuppression par fixation aux récepteurs à l'IL-6. Blocage de l'action de l'IL-6  | Infections  | Manifestations cutanées et muqueuses légères, ulcération buccale, stomatite |

Prise en charge des patients sous anticorps thérapeutiques en odontostomatologie

Author's personal copy

158

**Tableau I (Suite)**

| DCI                              | Nom commercial       | Cible                            | Domaine d'utilisation   | Effets/mécanismes d'action  | Effets indésirables généraux pouvant influencer sur la prise en charge dentaire  | Effets indésirables oro-faciaux                 |
|----------------------------------|----------------------|----------------------------------|---|---|--|---|
| Natalizumab                      | Tysabri®             | Intégrine α4                     | Sclérose multiple et maladie de Crohn   | Inhibiteur sélectif des molécules d'adhésion par fixation de la sous-unité α4 des intégrines à la surface des leucocytes exceptés les neutrophiles. Inhibition de la translocation des leucocytes mononucléés via l'endothélium vers les tissus parenchymateux inflammatoires | Infections   | Rien de signalé                                 |
| Sulésomab                        | LeukoScan®           | NCA-90 (antigène de granulocyte) | Ostéomyélite (imagerie)   | Fixation de l'anticorps IMMUMN3 marqué par du technétium (99mTc) à une structure antigénique commune à la glycoprotéine de surface (NCA-90) des granulocytes et au marqueur tumoral (antigène carcino embryonnaire [ACE])   | Rien de signalé  | Rien de signalé                                 |
| Dénosumab                        | Prolia®              | RANKL                            | Ostéoporose, métastases osseuses  | Fixation à RANKL avec une affinité et une spécificité élevées. Blocage de l'interaction RANK/RANKL à l'origine d'une réduction du nombre et une inhibition de la fonction des ostéoclastes  | Hypocalcémie, infections cutanées (principalement cellulites)  | Ostéonécrose des mâchoires                      |
| Certolizumab pégol<br>Infliximab | Cimzia®<br>Rémicade® | TNF-α<br>TNF-α                   | Maladie de Crohn<br>Polyarthrite rhumatoïdes, spondylarthrite ankylosante, Arthrite psoriasique, maladie de Crohn, colites ulcéreuses<br>Polyarthrite rhumatoïdes, spondylarthrite ankylosante, arthrite psoriasiques | Immunosuppression par fixation au TNF-α. Blocage de l'action du TNF-α, mort cellulaire programmée des lymphocytes activés par le TNF-α  | Désordres sanguins parfois graves, voire mortels. Infections graves. Lymphomes et cancers solides. Lésions hépatiques graves. Réactivation d'une hépatite B. Réactivation d'une tuberculose. Lupus médicamenteusement induit | Rien de signalé                                 |
| Golimumab                        | Simponi®             | TNF-α                            | Cancer colorectal métastatique  | Liaison au <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) et inhibition de la vasculogénèse et l'angiogénèse par blocage de la liaison du VEGF avec ses récepteurs. Inhibition de la croissance par inhibition de l'angiogénèse tumorale                                    | Troubles de la cicatrisation, hypertension artérielle, hémorragies, infections, insuffisance cardiaque   | Ostéonécrose des mâchoires, langue géographique |
| Bévacizumab                      | Avastin®             | VEGF-A                           | Dégénérescence maculaire néovasculaire (forme sèche)  | Liaison au <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) et inhibition de la vasculogénèse et de l'angiogénèse par blocage de la liaison du VEGF avec ses récepteurs. Inhibition de la néovascularisation responsable de la progression de la DMLA                         | Élévation pression oculaire, immunogénécité  | Rien de signalé                                 |

J. Demoin et al.

Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale 2014;115:152-163

(tuberculose), ou, paradoxalement, d'induction d'une réaction auto-immune (granulomatose). Ils doivent faire l'objet d'un bilan médical approfondi avant l'instauration du traitement et d'un suivi médical rigoureux [3]. Les répercussions buccodentaires recensées de certains AT peuvent être de 3 ordres ([tableau II](#)) : d'une part, les manifestations buccales ou faciales d'une affection systémique, d'autre part des atteintes des muqueuses buccales, et enfin une ostéonécrose des mâchoires.

### Manifestations bucco-faciales d'affections systémiques

Les conséquences de l'utilisation des AT sont peu décrites, mais découlent des affections systémiques rapportées suite à l'administration du traitement. L'apparition d'une ulcération buccale, associée à une toux, une dysphagie, une asthénie, une adénopathie satellite et une fièvre doit faire rechercher une réactivation de tuberculose [3]. L'apparition de nodules, papules ou ulcérations plus ou moins indolores doit faire exclure une granulomatose [3]. Des signes d'affection hépatique (ictère) chez des patients sous immunothérapie doivent faire exclure notamment une réactivation d'une hépatite B.

### Atteintes des muqueuses buccales

L'utilisation d'AT comme thérapeutique ciblée des cancers peut être à l'origine de mucites, soit de manière indépendante, soit de manière additive aux conséquences de la radiothérapie ou des chimiothérapies conventionnelles [12].

Ces mucites sont décrites principalement suite à la prise d'inhibiteurs du récepteur à l'*epidermal growth factor* (EGF), le cétuximab (Erbix<sup>®</sup>) et le panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>). Les toxicités orales reportées sont en plus d'une mucite, une xérostomie, une dysphagie et une pharyngite. L'apparition de ces signes semble plus fréquente pour certains auteurs lorsque la prise de cétuximab est associée à une radiothérapie. L'intensité des atteintes muqueuses semble moindre avec le panitumumab qu'avec le cétuximab [12].

Le bévazumab (Avastin<sup>®</sup>) est un anticorps monoclonal qui bloque l'angiogénèse. Il est utilisé surtout dans le traitement du cancer colorectal métastatique. Il est à l'origine de retard de la cicatrisation, d'une augmentation du risque hémorragique et de l'apparition d'ostéonécrose des maxillaires. Des mucites ont été décrites également avec ce traitement, notamment chez les patients atteints de psoriasis, qui se retrouve par ailleurs exacerbé [12–15]. Des langues géographiques ont été décrites chez les patients sous bévazumab [14]. Le trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) est utilisé dans le traitement du cancer du sein métastatique HER2+. L'apparition de mucites de faible intensité est décrite après son utilisation [12].

Il est difficile de relier une mucite buccale à la prise d'un AT, leur administration étant souvent concomitante à une chimiothérapie ou une radiothérapie, également pourvoyeuses de mucites.

### Ostéonécroses des mâchoires

L'utilisation du dénosumab (Xgéva<sup>®</sup>, Prolia<sup>®</sup>), par son action sur RANKL, peut représenter un risque d'apparition d'ostéonécrose des mâchoires [8]. Il agit sur la balance osseuse pour inhiber l'activité ostéoclastique. Il représente une alternative aux bisphosphonates pour les patients ostéoporotiques. Il est également utilisé en cancérologie pour la prévention des métastases osseuses et la prévention de la perte osseuse chez des femmes recevant des inhibiteurs de l'aromatase (Aromasine<sup>®</sup>, Arimidex<sup>®</sup>) pour un cancer du sein [8]. Dans une étude clinique de phase III chez des patients présentant une affection maligne avec atteinte osseuse, une ostéonécrose des mâchoires a été confirmée chez 1,8 % des patients traités par Xgéva<sup>®</sup> et chez 1,3 % des patients traités par acide zolédronique [8,16]. De même, le bévazumab peut être associé à l'apparition d'ostéonécrose des mâchoires [12,15]. Certains AT pourraient avoir des conséquences buccodentaires positives. Les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde présentent une prévalence accrue des maladies parodontales [17], liées à une augmentation de la production du TNF- $\alpha$ , en partie responsable de l'induction de la résorption osseuse [18]. L'utilisation d'anticorps anti-TNF- $\alpha$  est responsable d'une diminution de la quantité de TNF- $\alpha$  au sein du fluide gingival et d'une diminution de la perte osseuse alvéolaire. L'effet sur les signes cliniques inflammatoires de la maladie parodontale reste cependant controversé [18,19]. Le traitement par infliximab d'une polyarthrite rhumatoïde, ou d'autres maladies auto-immunes chez les patients souffrant également d'une maladie parodontale pourrait être aussi bénéfique pour le contrôle de cette infection [10,18,19].

### Précautions à prendre–recommandations dans la littérature

#### Prévention du risque infectieux

La susceptibilité aux infections est le premier élément à prendre en compte chez un patient sous AT.

Au niveau de la littérature francophone, deux organismes ont édité des recommandations concernant la prise en charge des patients sous immunothérapies : l'Afssaps (désormais ANSM), en 2011, sur la prise en charge des patients immunodéprimés, en odontostomatologie, auxquels peuvent être assimilés les patients sous anticorps thérapeutiques et le Club rhumatisme et inflammation, 2013 (CRI), pour la prise en charge des patients sous différents anticorps thérapeutiques (anti-TNF- $\alpha$ , anti-CD20, anti-IL-1 et anti-IL-6) pour le traitement d'affections rhumatismales auto-immunes. Ces recommandations peuvent être étendues à tous les autres domaines thérapeutiques où est utilisée l'immunothérapie ([tableau II](#)).

Toutes les recommandations s'accordent sur la nécessité d'éliminer les foyers infectieux dentaires avant la mise en place des protocoles d'immunothérapie. Un suivi régulier avec une attitude préventive est indispensable.

Author's personal copy

161

| Tableau II<br>Précautions à prendre en odontostomatologie vis-à-vis des principaux anticorps thérapeutiques-recommandations. |   |  |        |   |   |                               |  |
|--|---|--|--------|---|---|-------------------------------|--|
| Type de soin   | DCI                                       | Nom commercial   | Cible  | Recommandations CRI   | Recommandations MBCB/SFCO   | Recommandations SFSCMFCO      | Recommandations AFSSAPS/ANSM   |
| Soins non chirurgicaux (carie, détartrage, prothèse...)  | Atilizumab, tocilizumab                   | Actemra <sup>®</sup> , RoActemra <sup>®</sup>                      | IL6    | Pas de précautions particulières<br>Antibioprofylaxie <sup>3</sup> optionnelle<br>Soins parodontaux indispensables pour les patients sous anti-TNF-α                          | Élimination des foyers infectieux buccodentaires avant instauration du traitement immunosuppresseur | Aucune recommandation publiée | Prise de contact avec le médecin prescripteur pour connaître le niveau d'immunosuppression<br>Bilan buccodentaire tous les 4 mois.<br>Antibioprofylaxie <sup>3</sup> recommandée pour sondage parodontal et détartrage<br>Pas d'antibioprofylaxie pour les soins conservateurs et prothèse   |
|  | Rituximab                                 | MabThéra <sup>®</sup> , Rituxan <sup>®</sup>                       | CD20   |   |   | Aucune recommandation publiée |  |
|  | Canakimumab                               | Ilaris <sup>®</sup>  | IL1    |   |   | Aucune recommandation publiée |  |
|  | Infliximab, golimumab, certolizumab pégol | Rémicade <sup>®</sup> , Simponi <sup>®</sup> , Cimzia <sup>®</sup> | TNF-α  |   |   | Aucune recommandation publiée |  |
|  | Dénosumab                                 | Prolia <sup>®</sup> , Xgevia <sup>®</sup>                          | RANKL  | Aucune recommandation publiée   | Pas d'arrêt du dénosumab. Antibioprofylaxie <sup>3</sup> optionnelle                                | Aucune recommandation publiée | Anesthésie sans vasoconstricteurs <sup>4</sup>   |
|  | Bévacizumab                               | Avastin <sup>®</sup>   | VEGF-A | Aucune recommandation publiée   | Pas d'arrêt du bévacizumab. Antibioprofylaxie <sup>3</sup> optionnelle                              | Aucune recommandation publiée |  |
| Soins à risque infectieux chirurgicaux (extraction, granulome apical, abcès) et non chirurgicaux (surfaçage radiculaire)     | Atilizumab, tocilizumab                   | Actemra <sup>®</sup> , RoActemra <sup>®</sup>                      | IL6    | Arrêt du tocilizumab 4 semaines avant le soin<br>Antibioprofylaxie <sup>3</sup> recommandée   | Aucune recommandation publiée   | Aucune recommandation publiée | Prise de contact avec le médecin prescripteur pour connaître le niveau d'immunosuppression<br>Antibioprofylaxie <sup>3</sup> recommandée (soins endodontiques sur pulpe vitale ou non, surfaçages/débridement radiculaires, chirurgies)<br>Antibiothérapie <sup>5</sup> recommandée pour péri-implantite, pathologies parodontales nécrosantes et abcès parodontal |
|  | Rituximab                                 | MabThéra <sup>®</sup> , Rituxan <sup>®</sup>                       | CD20   | Non réalisation de la 2 <sup>e</sup> perfusion si le soin à lieu entre 2 perfusions (conséquences sur l'immunité durant 6 mois)<br>Antibioprofylaxie <sup>3</sup> recommandée | Aucune recommandation publiée   | Aucune recommandation publiée |  |
|  | Canakimumab                               | Ilaris <sup>®</sup>  | IL1    | Arrêt de l'anti-IL1 une semaine avant le soin<br>Antibioprofylaxie <sup>3</sup> recommandée   | Aucune recommandation publiée   | Aucune recommandation publiée |  |

J. Demerouti et al.

Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale 2014;115:152-163

Author's personal copy

Tableau II (Suite)

| Type de soin    | DCI                                       | Nom commercial   | Cible  | Recommandations CRI  | Recommandations MBCB/SFCO  | Recommandations SFSCMFCO  | Recommandations AFSSAPS/ANSM  |
|-----------------|---|--|--------|--|--|---|---|
| Pose d'implants | Infliximab, golimumab, certolizumab pégol | Rémicade <sup>®</sup> , Simponi <sup>®</sup> , Cimzia <sup>®</sup> | TNF-α  | Arrêt de l'anti-TNF-α. Antibiothérapie <sup>b</sup> recommandée  | Aucune recommandation publiée  | Aucune recommandation publiée   | Pas de traitements parodontaux chirurgicaux<br>Préférer le traitement endodontique et mise à plat de la dent à l'extraction<br>Antibiothérapie <sup>b</sup> démarrée la veille de l'intervention, jusqu'à cicatrisation complète du site opératoire<br>Intervention sous anesthésie locale avec vasoconstricteur<br>Intervention de manière atraumatique au niveau osseux<br>Régularisation osseuse et sutures hermétiques <sup>c</sup> |
|                 | Dénosumab                                 | Prolia <sup>®</sup> , Xgeva <sup>®</sup>                           | RANKL  | Aucune recommandation publiée  | Arrêt éventuel du dénosumab ? Antibiothérapie <sup>b</sup> recommandée                               | Aucune recommandation publiée   |   |
|                 | Bévacizumab                               | Avastin <sup>®</sup>   | VEGF-A | Aucune recommandation publiée  | Arrêt du bévacizumab 4 à 5 semaines avant l'intervention<br>Antibiothérapie <sup>b</sup> recommandée | Aucune recommandation publiée   |   |
|                 | Atlizumab, tocilizumab                    | Actemra <sup>®</sup> , RoActemra <sup>®</sup>                      | IL6    | Pas d'indication d'arrêt de l'anti-IL6<br>Gestion du risque infectieux<br>Pas de recommandations particulières | Aucune recommandation publiée  | Aucune recommandation publiée   |   |
|                 | Rituximab                                 | MabThéra <sup>®</sup> , Rituxan <sup>®</sup>                       | CD20   | Gestion du risque infectieux<br>Pas de recommandations particulières   | Aucune recommandation publiée  | Aucune recommandation publiée   |   |
|                 | Canakimumab                               | Ilaris <sup>®</sup>  | IL1    | Gestion du risque infectieux<br>Pas de recommandations particulières   | Aucune recommandation publiée  | Aucune recommandation publiée   |   |
|                 | Infliximab, golimumab, certolizumab pégol | Rémicade <sup>®</sup> , Simponi <sup>®</sup> , Cimzia <sup>®</sup> | TNF-α  | Pas d'indication d'arrêt de l'anti-TNF-α<br>Gestion du risque infectieux                                       | Aucune recommandation publiée  | Aucune recommandation publiée   |   |
|                 | Dénosumab                                 | Prolia <sup>®</sup> , Xgeva <sup>®</sup>                           | RANKL  | Aucune recommandation publiée  | Aucune recommandation publiée  | Pose d'implants possible, après évaluation du risque infectieux, lorsque le traitement est administré pour des pathologies osseuses bénignes<br>Pose d'implants contre-indiquée chez les patients traités pour des pathologies osseuses malignes <sup>c</sup> |   |
|                 | Bévacizumab                               | Avastin <sup>®</sup>   | VEGF-A | Aucune recommandation publiée  | Aucune recommandation publiée  |   |   |
|                 |   |  |        |  |  |   |   |

<sup>a</sup> Antibiothérapie : 2 g d'ampicilline ou 600 mg de clindamycine 1 h avant l'acte.

<sup>b</sup> Antibiothérapie : 2 g/jour en deux prises d'ampicilline ou 1200 mg/jour en deux prises (cf. recommandations professionnelles – Afssaps, 2011 – pour plus de précision).

<sup>c</sup> Par analogie aux recommandations publiées sur les bisphosphonates en odontostomatologie (cf. recommandations professionnelles – Afssaps, 2011 – pour plus de précision).

Prise en charge des patients sous anticorps thérapeutiques en odontostomatologie

L'Afssaps préconise que chez les patients immunodéprimés « le risque infectieux est considéré comme lié à tout facteur responsable d'une immunodépression, qu'elle soit congénitale ou acquise. En l'absence de critères objectifs, biologiques ou cliniques, permettant de l'évaluer, la décision d'inclure un patient dans cette catégorie de risque doit être prise en bonne intelligence entre, d'une part, le chirurgien-dentiste ou le stomatologue et, d'autre part, les médecins concernés » (AFSSAPS, 2011). Il est indispensable de connaître le niveau d'immunosuppression avant tout acte impliquant une effraction de la muqueuse buccale, à risque de dissémination bactérienne, excepté les actes d'anesthésie (sauf intraligamentaire). Les précautions à prendre (antibioprophylaxie, antibiothérapie) seront décidées conjointement avec le médecin prescripteur. Chez les patients immunodéprimés, le bénéfice de la réalisation de l'acte chirurgical devra être confronté au risque infectieux en respectant la prescription d'une antibioprophylaxie. Ces recommandations peuvent être discutées en fonction de la balance bénéfice/risque. Face au faible recul sur le sujet et à la difficulté de déterminer le niveau de risque infectieux chez le patient immunodéprimé, ce manque de précision dans les recommandations peut amener les praticiens à des prescriptions d'antibioprophylaxie, motivées par le principe de précaution. L'indication de l'antibioprophylaxie est à discuter en fonction des AT administrés, en attendant d'avoir des données publiées de pharmacovigilance, plus documentées et dédiées aux complications infectieuses de ces traitements.

Le CRI insiste sur le suivi du patient, l'importance de l'obtention et du maintien d'une hygiène buccodentaire adaptée et la réalisation de tous les soins nécessaires avant la mise en place du traitement. Pour les soins non chirurgicaux, il n'existe pas de contre-indication et il n'est pas nécessaire de moduler le traitement par AT. Cependant, pour le CRI, ce type de soins pourrait nécessiter une antibioprophylaxie. Quant aux soins à risque infectieux, l'antibioprophylaxie est indispensable. L'arrêt de l'administration des différents AT est recommandé avant l'intervention, avec des modalités différentes en fonction de l'AT (*tableau II*). Enfin, pour le CRI, la pose d'implants chez un patient sous AT, ne nécessiterait pas « de précautions particulières à condition de rester vigilant sur la survenue potentielle d'infections ».

Il faudra préciser néanmoins que, même si la pose d'implants se fait dans des conditions d'asepsie rigoureuses, l'effraction muqueuse et l'exposition osseuse peuvent justifier la mise en place d'une antibioprophylaxie. En outre, la pose d'implants chez ces patients, dont certains sont atteints de pathologies lourdes, ne dépend pas seulement d'une indication médicale ; la dimension éthique et la qualité de vie sont des aspects importants en prendre en compte.

### Prévention du risque d'ostéonécrose

Pour les patients sous dénosumab ou bécacizumab, le risque de survenue d'ostéonécrose des mâchoires doit être pris en

compte, notamment avant la réalisation d'actes à risque au niveau de la cavité buccale.

Pour rappel, chez les patients traités par bisphosphonates par voie intraveineuse (IV), l'Afssaps recommande d'effectuer un contrôle dentaire tous les 4 mois et d'éviter autant que possible les actes chirurgicaux et les extractions dentaires (Afssaps, 2007). Pour une dent délabrée, il faut préférer le traitement endodontique et la mise à plat de la dent plutôt que son avulsion. Si l'extraction est inévitable, il faudra placer le patient sous antibiothérapie la veille de l'intervention et ce jusqu'à cicatrisation complète du site opératoire. L'intervention devra par ailleurs être réalisée sous anesthésie locale sans vasoconstricteur, de manière atraumatique au niveau osseux, avec régularisation de l'os et sutures hermétiques. La pose d'implants chez des patients traités par bisphosphonates oraux dans le cadre de pathologies osseuses bénignes (ostéoporose ...) est possible, en prenant les mêmes précautions que pour toute chirurgie orale. Aucune donnée ne permet d'apprécier le risque lié à la pose d'implant chez un patient sous bisphosphonates IV (injection annuelle de zolédronate) dans le cadre du traitement de l'ostéoporose. Par contre, la pose d'implants est formellement contre-indiquée pour des patients traités par bisphosphonates IV pour des pathologies osseuses malignes (Société française de stomatologie, chirurgie maxillo-faciale et chirurgie orale [SFSCMFCO], 2013).

Les effets du dénosumab sont proches de ceux des bisphosphonates. Les mécanismes d'action entre ces deux produits sont par contre sensiblement différents [8]. Les recommandations concernant le dénosumab sont ainsi les mêmes que pour un patient sous bisphosphonates [8]. Cependant, sa demi-vie moyenne est de 28 jours, bien inférieure à celle des bisphosphonates. Les effets sont donc plus rapidement réversibles : le taux de survenue d'une ostéonécrose reste sensiblement le même entre les deux types de traitement, mais le taux de résolution d'une ostéonécrose liée au dénosumab semble plus favorable qu'avec l'acide zolédronique [8,18]. Par ailleurs, contrairement aux bisphosphonates, le dénosumab n'est pas incorporé dans la matrice osseuse et un retour à l'état normal des marqueurs de la résorption osseuse est observé 6 mois après la dernière injection. Même si le risque d'ostéonécrose est connu comme pour les bisphosphonates, la réalisation des actes chirurgicaux après 6 mois d'arrêt du traitement semble envisageable, avec un risque d'ostéonécrose très faible [20].

Le risque hémorragique et le retard de cicatrisation liés au traitement par bécacizumab font l'objet de recommandations en chirurgie générale, mais aucun consensus n'existe actuellement en chirurgie buccale. Par analogie, certains auteurs conseillent d'attendre 4 à 8 semaines après l'arrêt du traitement pour réaliser toute avulsion dentaire [21]. Le risque d'ostéonécrose semble par ailleurs majoré lorsque le bécacizumab est associé à des bisphosphonates [15].

Le chirurgien dentiste ou le stomatologue ont un rôle essentiel de surveillance pharmacologique des traitements. Ils

doivent rapporter au praticien prescripteur les effets secondaires observés. De même, le risque éventuel lié aux soins buccodentaires doit être évalué et des protocoles adaptés aux différents types d'anticorps thérapeutiques sont nécessaires.

## Discussion

La prise en charge des patients bénéficiant de ces traitements au cabinet dentaire risque d'être de plus en plus fréquente et il faut prendre notamment en compte le risque infectieux potentiel. Un bilan buccodentaire et une attitude préventive sont indispensables avant la mise en place d'une immunothérapie. De même, les décisions de traitement et d'anti-bioprophyllaxie devront être réalisées en fonction du statut immunologique du patient et en relation avec le praticien traitant. La survenue de manifestations hémorragiques ou d'ulcérations au niveau buccal et facial devra être relevée et signalée au praticien traitant. Ces manifestations nécessiteront une prise en charge précoce.

Enfin, des recommandations spécifiques de la conduite à tenir pour la prise en charge au niveau odontostomatologique sont nécessaires dans ce domaine.

## Déclaration d'intérêts

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

## Références

- [1] Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S3–23.
- [2] Gea-Banacloche JC. Rituximab-associated infections. *Semin Hematol* 2010;47:187–98.
- [3] Borchers AT, Leibushor N, Cheema GS, Naguwa SM, Gershwin ME. Immune-mediated adverse effects of biologicals used in the treatment of rheumatic diseases. *J Autoimmun* 2011;37:273–88.
- [4] Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* 2009;157:220–33.
- [5] Fujimura T, Okamoto Y, Taniguchi M. Therapeutic effects and biomarkers in sublingual immunotherapy: a review. *J Allergy (Cairo)* 2012;2012:381737.
- [6] Buch MH, Emery P. New therapies in the management of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:245–51.
- [7] Wootla B, Lacroix-Desmazes S, Warrington AE, Bieber AJ, Kaveri SV, Rodriguez M. Autoantibodies with enzymatic properties in human autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2011;37:144–50.
- [8] Malan J, Ettinger K, Naumann E, Beirne OR. The relationship of denosumab pharmacology and osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114:671–6.
- [9] Clifton GT, Peoples GE. Overcoming cancer immune tolerance and escape. *Clin Cancer Res* 2009;15:749–51.
- [10] Mayer Y, Elimelech R, Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y, Machtei EE. Periodontal condition of patients with autoimmune diseases and the effect of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *J Periodontol* 2013;84:136–42.
- [11] Hendler A, Mulli TK, Hughes FJ, Perrett D, Bombardieri M, Hourri-Haddad Y, et al. Involvement of autoimmunity in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *J Dent Res* 2010;89:1389–94.
- [12] Watters AL, Epstein JB, Agulnik M. Oral complications of targeted cancer therapies: a narrative literature review. *Oral Oncol* 2011;47:441–8.
- [13] Popa AM, Valla K, Radhakrishnan L, Cuellar S, Villano JL. Bevacizumab-induced oral mucositis in background of cutaneous plaque-type psoriasis. *Ann Pharmacother* 2012;46:e32.
- [14] Gavrilovic IT, Balagula Y, Rosen AC, Ramaswamy V, Dickler MN, Dunkel LJ, et al. Characteristics of oral mucosal events related to bevacizumab treatment. *Oncologist* 2012;17:274–8.
- [15] Guarneri V, Miles D, Robert N, Dieras V, Glaspy J, Smith I, et al. Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;122:181–8.
- [16] Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol* 2012;23:1341–7.
- [17] Mercado FB, Marshall RI, Bartold PM. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol* 2003;30:761–72.
- [18] Pers JO, Sarau A, Pierre R, Youinou P. Anti-TNF-alpha immunotherapy is associated with increased gingival inflammation without clinical attachment loss in subjects with rheumatoid arthritis. *J Periodontol* 2008;79:1645–51.
- [19] Mayer Y, Balbir-Gurman A, Machtei EE. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy and periodontal parameters in patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol* 2009;80:1414–20.
- [20] Hellstein JW, Adler RA, Edwards B, Jacobsen PL, Kalmar JR, Koka S, et al. Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc* 2011;142:1243–51.
- [21] Gounant V, Milleron B, Assouad J, Gligorov J, Lavole A, Wislez M, et al. Bévazicuzab et actes invasifs : recommandations pratiques. *Rev Mal Respir* 2009;26:221–6.

## **Résumé article 1**

Dans cet article, après avoir expliqué les principes, les objectifs, les domaines d'application des immunothérapies, les pathologies concernées et les complications liées aux traitements par immunothérapie qui peuvent être observées par l'odontologiste. Nous avons ensuite discuté des recommandations du CRI, une société savante de rhumatologie, et de l'ANSM (AFFSAPS) pour l'odontologie, qui ne sont pas toujours concordantes.

Les recommandations de prescription des antibiotiques en odontologie (2011) traitent du patient immunodéprimé ou de la prévention du risque d'ostéochimionécrose et peuvent s'appliquer aux patients sous immunothérapies, cependant, la réalisation d'une antibioprophylaxie quasi-systématique pour les patients immunodéprimés est recommandée, sans distinction de l'origine et de l'importance de l'immunodépression. Ces recommandations ne sont pas en accord avec celles décrites sur certaines immunothérapies par le CRI.

La conclusion de ce travail est qu'il n'y a pas de consensus précis. Il nous paraît donc judicieux de contacter le praticien prescripteur pour discuter de la pertinence d'une éventuelle antibioprophylaxie dans la prise en charge du patient ou d'une modulation du traitement par immunothérapie.

## **Discussion**

Depuis la publication de cet article, aucune évolution n'a été proposée quant à la prise en charge des patients sous immunothérapies alors que de nouveaux traitements sont régulièrement mis sur le marché. Par ailleurs, plusieurs études ont été publiées récemment sur l'importance du microbiote intestinal sur l'efficacité des immunothérapies, notamment anticancéreuses [503-505]. Une modification du microbiote intestinal induite par la prise systématique d'antibiotiques semble être une explication de la variation de l'efficacité des immunothérapies chez certains patients. Ceci est un argument supplémentaire qui doit inciter à rechercher un consensus dans la prise en charge de ces patients, et l'arrêt de l'antibioprophylaxie systématique. Un suivi odontologique régulier des patients sous immunothérapie doit être recommandé afin de limiter le risque infectieux ainsi qu'une visite systématique chez le dentiste en amont à la recherche de tout foyer à risque infectieux afin de le traiter ou l'éliminer avant la mise en place de l'immunothérapie.



Article 2 : Interleukin 6 receptor inhibitor tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  concentration in gingival crevicular fluid of rheumatoid arthritis patients with periodontitis: a preliminary prospective study in twelve patients. (soumis)

Article 3 : Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. (publié)

La PR est une maladie inflammatoire chronique et auto-immune faisant intervenir des mécanismes dérégulés. Les maladies parodontales sont également des maladies inflammatoires chroniques avec une étiologie bactérienne. Au sein du biofilm bactérien, *Pg*, sécrète une enzyme (PPAD - Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase -) qui a des capacités de citrulliner les protéines et est supposé être un facteur étiologique potentiel de la PR [506].

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux immunothérapies utilisées dans le cadre du traitement de la polyarthrite rhumatoïde, et pouvant notamment avoir des effets sur le LB :

- L'immunothérapie anti-IL6R : effets du Tocilizumab (TCZ) sur le parodonte
- L'immunothérapie anti-CD20 : effets du Rituximab (RTX) sur le parodonte

Nous souhaitons ainsi voir si l'utilisation de différents types d'immunothérapie pouvait avoir des effets positifs ou négatifs sur l'évolution d'une parodontite, sans traitement.

**Interleukin 6 receptor inhibitor tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  concentration in gingival crevicular fluid of rheumatoid arthritis patients with periodontitis: a preliminary prospective study in twelve patients.**

Assem Soueidan<sup>1</sup>, Zahi Badran<sup>1</sup>, Jean Michel Nguyen<sup>2</sup>, Yves Maugars<sup>3</sup>, Alain Saraux<sup>4</sup>, Hervé Boutigny<sup>5</sup>, Julien Demoersman<sup>4\*</sup>, Jacques-Olivier Pers<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Periodontology (UIC Odontology, CHU, Rmes, Inserm U1229), Faculty of Dental Surgery, University of Nantes, 1, place Alexis-Ricordeau, 44093 Nantes cedex, France. [assem.soueidan@univ-nantes.fr](mailto:assem.soueidan@univ-nantes.fr); [zahi.badran@univ-nantes.fr](mailto:zahi.badran@univ-nantes.fr)

<sup>2</sup>SEB (Soutien Epidémiologie et Biostatistiques) CHU Nantes, 85, rue Saint Jacques 44093 Nantes Cedex 01. [jeanmichel.nguyen@chu-nantes.fr](mailto:jeanmichel.nguyen@chu-nantes.fr)

<sup>3</sup>Rheumatology Department, University Hospital, 1, place Alexis-Ricordeau, 44093 Nantes cedex, France. [yves.maugars@chu-nantes.fr](mailto:yves.maugars@chu-nantes.fr)

<sup>4</sup>U1227, B lymphocytes and Autoimmunity, Université de Brest, Inserm, Labex 'Immunotherapy, Graft, Oncology', 29609 Brest Cedex, France. [alain.saraux@chu-brest.fr](mailto:alain.saraux@chu-brest.fr); [pers@univ-brest.fr](mailto:pers@univ-brest.fr); [Julien.demoersman@gmail.com](mailto:Julien.demoersman@gmail.com)

<sup>5</sup>EA2216, INSERM ESPRI, ERI29. Department of Periodontology, Faculty of Dental Surgery, Brest, France. [herve.boutignyvella@univ-brest.fr](mailto:herve.boutignyvella@univ-brest.fr)

\*Both authors contributed equally to this work.

**Correspondence to:** Pr. Assem Soueidan

[assem.soueidan@univ-nantes.fr](mailto:assem.soueidan@univ-nantes.fr)

telephone : (33)2 40 41 29 23

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

Fax : (33) 2 40 20 18 6

**Abstract**

Rheumatoid arthritis (RA) and periodontitis are chronic inflammatory diseases and share many clinical and pathological features, one of which is the involvement of interleukin 6 (IL-6) in the pathogenesis of both diseases. To date, recent studies demonstrate a beneficial impact on periodontal status of systemic anti IL-6 receptor therapy, but biologic effects of this medication on periodontium are to precise. The aim of this observational study was to investigate the effects of tocilizumab (TCZ) on the periodontium by comparing the clinical parameters and cytokine concentrations in the gingival crevicular fluid (GCF) of RA and periodontitis patients before and after treatment with the IL-6 receptor inhibitor TCZ. Periodontal parameters were assessed in 12 subjects with RA before their first infusion of TCZ and again six months later. Clinical periodontal parameters, GCF volume, pro- and anti-inflammatory cytokine levels and periodontopathogenic bacteria were analyzed. After six months, TCZ therapy significantly decreased GCF tumor necrosis factor  $\alpha$  levels in sites with deep periodontal pockets and severe attachment loss, although the GCF concentrations of IL-6 and other analyzed cytokines were unchanged. In addition, clinical periodontal parameters and GCF volume decreased significantly after TCZ treatment. Within the limitations of this preliminary report, we suggest that anti-IL-6 receptor therapy could be beneficial for deep periodontal pockets and that IL-6 plays an important role in this disease. This work can contribute to better understanding of pathogenesis of periodontitis, their relationship with RA, and lays a foundation for further research into the development of relevant local periodontal therapies.

**ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01806974.**

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

**Keywords:** Anti IL-6 receptor; cytokines; periodontitis; rheumatoid arthritis; host modulation therapy.

### **Introduction**

Periodontitis is a chronic inflammatory disease characterized by alveolar bone resorption and attachment loss, which lead to tooth loss. Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune systemic inflammatory disease. Both chronic inflammatory diseases share many pathological and clinical characteristics <sup>1</sup>.

Periodontitis is more frequent and severe in patients with RA than in those without RA, and RA patients are significantly more likely to suffer from tooth loss <sup>1</sup>. The radiological aspects and clinical characteristics of periodontitis are correlated with those of RA <sup>2,3</sup>, and the risks for RA and periodontitis include HLA-DRB1-04 <sup>3,4</sup>, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infection and smoking <sup>5,6</sup>. In addition, high loads of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) - the single bacterium in the oral flora containing a peptidyl-arginine deiminase (PAD) enzyme - are present in the synovial membranes of RA patients <sup>7</sup> and in the gingiva of periodontitis patients <sup>8</sup>. PAD can promote the citrullination of various self-antigens <sup>9</sup> and anti-citrullinated protein antibodies, which have been identified in gingival crevicular fluid (GCF) originating from diseased gingival tissue <sup>10</sup>.

Similar cytokine profiles have been documented in the pathogenesis of RA and periodontitis <sup>1</sup>, and certain features of the inflammatory response are observed in both RA and periodontitis and might be supported by various common biological pathways.

Interleukin 6 (IL-6) is a pro-inflammatory cytokine that may be associated with periodontitis and RA <sup>11-13</sup>. Compared with healthy controls, periodontitis patients were reported to have more inflamed gingival tissue and higher GCF and serum IL-6 levels <sup>12-15</sup>. CGF IL-6 levels are higher in active periodontal site, compared to inactive periodontal site <sup>16</sup>. Periodontal treatment has contributed to decreased serum IL-6 concentrations in periodontitis

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

patients<sup>17,18</sup>. Similarly, serum, synovial tissue, and synovial fluid IL-6 levels were higher in RA patients than in individuals with non-inflammatory arthritis<sup>19</sup>. In addition, serum IL-6 expression levels were correlated with RA disease activity<sup>20</sup>. Taken together, these results suggest that IL-6 overexpression is a feature common to both periodontitis and RA.

The monoclonal antibody tocilizumab (TCZ) is a recombinant humanized anti-human IL-6 receptor (IL-6R)<sup>21</sup>. TCZ competitively inhibits IL-6 signaling by binding the IL-6 binding site of human IL-6R membrane (mIL6R) and soluble receptors (sIL-6R), an 80-kDa ligand-binding chain. Both membrane and soluble receptor interact with a 130-kDa non-ligand-binding signal-transducing chain glycoprotein 130 (gp130) which are responsible for agonist and antagonist effects<sup>12,22-24</sup>. The therapeutic efficacy of TCZ has been demonstrated in adults with moderate-to-severe active RA in several clinical trials without causing significant side effects<sup>25-28</sup>. In 2014, Kobayashi et al. demonstrated that RA and periodontitis patients showed greater reductions in periodontal inflammation levels during TCZ therapy than did those who received medication without TCZ<sup>29</sup>. In 2015, they also showed that TCZ therapy significantly decreased serum tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels<sup>30</sup>. The purpose of the present study was to investigate the local effects of TCZ on periodontal clinical parameters and on the expression of cytokines in the GCF.

## **Methods**

### ***Subjects***

Twelve patients with at least 10 teeth and RA monitored at the rheumatology service of Nantes Hospital and Brest Hospital (France) were recruited between May 2013 and January 2016 (mean age,  $52.8 \pm 11.5$  years; 8 females, 4 males, and 7 smokers). The twelve patients met the criteria for RA of the American College of Rheumatology and received different disease-modifying antirheumatic drugs DMARDs<sup>31</sup>. At the time of inclusion, the mean duration of RA was  $14.6 \pm 10.9$  years, disease activity was measured by the disease activity

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

score using C-reactive protein (DAS-28 CRP) ( $3.58 \pm 1.02$ ), and the serum CRP levels were  $13.49 \pm 10.13$  mg/L.

The exclusion criteria included the following: 1) an antibiotic treatment within the previous 2 months; 2) diabetes mellitus, pregnancy, or Sjögren's syndrome; and 3) a history of periodontal treatment within the previous 3 months. All procedures performed were in accordance with the ethical standards and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study prior to their inclusion, and the study protocol was approved by the institutional review board at the Nantes University Hospital (Eudract 2012-002931-27).

The study plan consisted of the following 3 steps: 1) patient recruitment by rheumatology department before TCZ treatment, followed by periodontal examination and bacterial and GCF sampling (M0); 2) patient referral to the rheumatology department to start TCZ infusions (RoActemra, 20 mg/ml intravenous infusions), with one infusion per month for six months; 3) six months later (M6), patient examination by the same periodontal procedure used at M0.

#### ***Clinical assessments***

The RA disease activity was grouped into four categories according to the DAS-28 CRP of 28 joints<sup>32</sup>. All clinical examinations were routinely performed by the same trained and calibrated examiners (AS and JD). To check the intra- and inter-examiner agreement, measurements of PD and CAL were recorded and repeated within a 2-week interval in three randomly selected chronic periodontitis patients. Data were analyzed with the non-parametric  $\kappa$  test and intra-class correlation was determined. The  $\kappa$  coefficients for intra- and inter-examiner and intra-class correlation coefficients were  $>0.85$ . The whole-mouth clinical

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

periodontal parameters, including the modified O'Leary plaque index, modified bleeding on probing (BOP), clinical attachment loss (CAL) and pocket depth (PD), were determined at six sites per tooth. PD was calculated as the distance in mm from the most coronal portion of the free gingival margin to the most apical penetration of periodontal probe. CAL was defined as the distance in mm from the cemento-enamel junction to the most apical penetration of the probe. PD and CAL were measured with a Williams probe. All periodontal chart measurements were noted in a programmed Excel table (Microsoft, 2011). Clinical indices, periodontal scores and diagnosis according to the classification by Eke and Page were automatically calculated for each subject <sup>33</sup>.

A detailed and comprehensive analysis by site was performed for all the patients (6 sites per teeth, 1594 sites for all patients). All sites were compiled, and the evolution of each site was assessed throughout the study. In all patients, we determined 3 groups of sites according to severity: group 0 (no attachment loss, no periodontal pocket) was considered a healthy (non-inflammatory) or reference group; group 1 (CAL > 0 mm, PD ≤4 mm) considered as no or mild periodontitis sites with or without recession; and group 2 included sites with attachment loss and deep periodontal pockets (CAL> 0 mm, PD ≥ 5 mm, with or without recession) and was considered a pathological inflammatory group.

No hygiene instructions were given to the patients at baseline to avoid bias. Patients with periodontal disease were informed of the diagnosis, and care was proposed at the end of the observational period (6 months after inclusion).

#### ***Case definition of periodontitis***

We used the definitions below proposed by the CDC periodontal disease surveillance work group and supported by the American Academy of Periodontology to define periodontitis severity <sup>33</sup>.

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

Severe periodontitis: 2 or more interproximal sites with  $\geq 6$  mm CAL (not on the same tooth) and one or more interproximal site(s) with  $\geq 5$  mm PD.

Moderate periodontitis: 2 or more interproximal sites with  $\geq 4$  mm clinical CAL (not on the same tooth) or 2 or more interproximal sites with PD  $\geq 5$  mm, also not on the same tooth.

Mild periodontitis: 2 or more interproximal sites with  $\geq 3$  mm CAL and  $\geq 2$  interproximal sites with  $\geq 4$  mm PD (not on the same tooth) or one site with  $\geq 5$  mm PD.

The subjects were objectively classified in an initial examination (M0) and 6 months later (M6) according to severe, moderate, mild or no periodontitis and to localized or generalized periodontitis.

#### ***GCF and microbiological sampling***

Four gingival fluid samples were collected for each patient (n=48). Then, subgingival plaque samples were collected at the same sites (n=48). In each patient, 4 gingival fluid samples were collected in both the 2 deepest periodontal sites defined by the charting previously realized and 2 healthy sites (the default sites were at 16 and 41 or at the nearest mesial tooth site). Following site isolation to prevent contamination, supragingival plaque was removed gently with compresses, the tooth was dried with sterile cotton wipes, and a 30 s GCF sample was collected on filter strips (Periopapers, Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, USA). Periopaper strips were gently inserted subgingivally. GCF volume was determined using a Periotron 8000s (Oraflow Inc., Plainview, NY, USA) calibrated following the protocol described by <sup>34</sup>. Samples were immediately placed in Eppendorf tubes containing 75  $\mu$ l of PBS-Tween and stored at -80°C. GCF samples contaminated with blood were discarded. All GCF samples were shipped to an immunology laboratory (CIMNA, CHU Hotel-Dieu, Nantes). Subgingival plaque samples were collected (at least 15 minutes after GCF sampling)

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*



using sterile paper points according to the manufacturer's instructions (n=48). After mechanically removing the supragingival plaque with curettes and sterile cotton wipes, the sampling site was gently dried with an air syringe. A sterile paper point (Henry-Schein, Melville, NY, USA) was then inserted into the periodontal pocket and held for 30 s, avoiding any salivary contamination. Then, the paper point was immediately placed in an Eppendorf tube and stored at -80°C.

***Cytokine quantification by multiplexed bead immunoassay (Luminex)***

Cytokine levels were determined using high-sensitivity human cytokine magnetic bead kits from Merck Millipore (St-Quentin-en-Yvelines, France), as well as a Luminex® 100™ instrument and Bio-Plex Manager 6 software (Bio-Rad). The commercial 13-plex kits were used to analyze the sample levels of thirteen cytokines, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, interferon γ, GM-CSF, and TNF-α. The concentrations are expressed in pg/ml. Only 7 cytokines (IL-1β, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, and TNF-α) have been detected in GCF and analyze was only performed on these cytokines. The other cytokines concentrations in GCF were probably under detection level of the kit to be analyzed.

***Microbiological analysis by qPCR***

The qPCR test system is based on the detection of species-specific sequences of rDNA. Each pathogen and the total bacterial load were detected and quantified in a separate reaction using a hydrolysis probe via real-time PCR (Carpegen®, Perio Diagnostik, Germany). This probe is also responsible for the generation of fluorescence, the intensity of which is proportional to the amount of amplified PCR product. The emission of fluorescence is measured in each PCR cycle, and the cycle number at which the fluorescence intensity reaches a defined threshold is used to quantify the initial template copy number. The following periopathogens were detected by the qPCR test system with a limit of detection of  $1 \times 10^2$  cells: *Aggregatibacter*

*Tocilizumab reduce TNF-α GCF concentration in periodontitis*

*Actinomyces comitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf), *Prevotella intermedia* (Pi), and *Fusobacterium nucleatum* (Fn). In addition, the total bacterial load of all bacteria in each patient sample was quantified.

#### ***Statistical analysis***

We used an analytical site-centered approach to identify parameter modifications at the site level. Statistical analyses were performed to observe the variations in clinical (modified O'leary PI, modified BOP, PD, and CAL), biological (cytokine concentration) and microbiological parameters (bacterial load and periopathogenic percentage) before and after TCZ treatment.

Comparisons were made among sites in group 0, group 1, and group 2.

Periodontal clinical parameters, DAS-28 CRP and serum CRP levels and GCF volume for each selected site for each patient at M6 were compared with the corresponding M0 parameters using the Wilcoxon signed-rank test, which is the most robust and adapted model for this experimental situation.

Other parameters at the site level at M6 were also compared with those at M0. A general linear mixed model was used to account for correlations between repeated measurements from the same patient (random effects). R software version 3.2 was used for all analyses. The threshold for two-sided alpha risk was set at 5%.

#### **Results**

Rheumatoid diagnosis, individual characteristics of each subject, and DMARDS antecedents are reported in table 1. DAS-28 CRP and serum CRP levels were improved 6 months after TCZ treatment: DAS-28 CRP ( $2.58 \pm 0.71$  at M6, versus  $3.58 \pm 1.02$  at M0 ( $p=0.0049$ )) and serum CRP level ( $2.68 \pm 2.75$  at M6 versus  $13.49 \pm 10.13$  at M0 ( $p=0.00005$ )) (Table 1.2).

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

Most patients treated with TCZ had previously been cared by methotrexate or long-term corticotherapy, or both.

***TCZ treatment did not change the clinical diagnosis but reduced CAL, PD and BOP at level site***

No variation in individual patient periodontal diagnosis was observed between M0 and M6. At patient level, average CAL, PD and BOP are not significantly modified by TCZ treatment between M0 and M6. In addition, PI was unchanged for each patient between M0 and M6 (Table 1.2). However, we observed significantly different CAL and PD among groups 0 (intercept), 1 and 2, particularly in group 2. CAL and PD were reduced after TCZ treatment ( $p=0.00919$ ). BOP was reduced after TCZ treatment only in group 2 ( $p<0.0001$ ) (Table 2).

***GCF volume measurement***

The volumes of GCF collected and calculated from the Periotron scores ranged between 0.04 and 1.60  $\mu\text{l}$  (mean, 0.75  $\mu\text{l}$ ). The average GCF volumes for each patient at M0 and M6 were calculated and compared. No statistically significant change in GCF volume as observed after TCZ treatment, although a non-significant decrease in the GCF volume ( $p=0.0673$ ) after TCZ treatment was observed (Table 3).

***Reduction in TNF- $\alpha$  concentrations at M6 after TCZ treatment***

As previously indicated, some of the cytokine concentrations were undetectable in more than half of the sites, rendering these results not interpretable; for this reason, only data for IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13 and TNF- $\alpha$  were interpretable and considered (Table 4). No differences among the groups were observed, except for TNF- $\alpha$ , which was significantly reduced in group 2 compared with group 0 ( $p=0.0423$ ) after TCZ treatment.

***Bacterial load and periopathogen percentage remained the same after TCZ treatment***

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

No qualitative or quantitative changes were observed in the bacterial load or the percentage of periopathogens among the 3 groups before and after TCZ treatment (Table 5).

### **Discussion**

The objective of this observational and longitudinal study was to investigate the consequences of an anti-IL-6R therapy on biological and clinical periodontal parameters. Within the limits of the small number of patients, our results showed that TCZ improved periodontal local clinical parameters and significantly reduced TNF- $\alpha$  concentrations in deep periodontal pockets. TCZ therapy was effective on RA activity, notably with an important decrease of serum CPP-level and DAS-28-CRP score after 6 months TCZ therapy. In contrary to Kobayashi et al.<sup>29</sup>, we didn't show significant modifications of global periodontal status and periodontal diagnosis at six months. The short time between measurements (6 months in our study versus 20 months) after TCZ therapy induction could explain the divergence of our results and those of Kobayashi et al.<sup>29</sup>.

Due to the comparable level of plaque control at baseline and M6, it seemed that the improvement in some local periodontal conditions was independent of the patient oral hygiene status and probably attributable to TCZ 6 months therapy.

In this study, we particularly wanted to observe the effects of treatment with TCZ at the periodontal site level because we believe that the potential effects of the TCZ treatment would have been more difficult to observe clinically at the patient level. Furthermore, periodontal diseases have long been described as site-specific diseases with a non-linear, non-synchronized and cyclic evolution<sup>35</sup>. It is understood that healthy and periodontal disease-affected sites can coexist, even on the same tooth. We then identified 3 gradually stratified groups of sites depending on the severity of the lesion in each site, which can differentiate

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

severe inflammatory and no or mild inflammatory sites: group 0 (reference or healthy group), group 1 (recession or mild lesion group), and group 2 (severe group).

Our analysis was performed at the periodontal-site level (6 sites per teeth), which allowed us to obtain 96 samples for analysis on 48 sites (8 sites per patient for gingival fluid analysis and 8 sites per patient for microbiological analysis). It should be noted that of course TCZ alone cannot be considered for the treatment of periodontitis, but we searched to know whether the treatment of RA by TCZ had any influence at the periodontal level. Similarly, from an ethical point of view, it was not possible to randomize with an untreated control group of RA patients eligible to TCZ. In addition, making comparisons with periodontal patients without RA would introduce a major bias due to systemic inflammatory background.

Our results showed that a patient's clinical situation did not change after treatment with TCZ, according to Eke and Page classification<sup>33</sup>. This was expected firstly because IL-6 is one factor among many in the complex inflammatory process and secondly because no periodontal etiological treatment was performed.

At the site level, we were unsure whether TCZ would lead to decreased or increased inflammatory conditions and PD at affected sites or even to the initiation of periodontal disease at healthy sites. Indeed, the duality and complexity of anti-IL-6R action precluded the determination of whether its inhibition would lead to pro- or anti-inflammatory effects<sup>24,36</sup>.

Interestingly, at the site level, significant PD reduction and CAL gain were observed in groups 1 and 2, but BOP reduction was only observed in severe sites, i.e., in group 2. We suggest that the inflammatory sites are most receptive to TCZ treatment; our finding are the first observations demonstrating the effect of TCZ therapy on the GCF TNF- $\alpha$  concentration, signifying that TCZ therapy has not only a systemic effect but also a local effect at the level site in the periodontium. Indeed, two signaling pathway are mediated by IL-6R: a classical signaling via a mIL-6-R and a trans-signaling pathway after an interaction between a sIL-6R

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

and gp130, an relatively ubiquitous trans-membrane protein <sup>24</sup>. IL-6 appears to have a proinflammatory role through trans signaling and a role in anti-inflammatory and repair processes via the classical signaling pathway <sup>23,37</sup>. Furthermore, best responses to TCZ in RA were associated with a high level of IL-6 and a low level of sIL-6R <sup>38</sup>. Otherwise, a recent work demonstrated that the IL-6/IL-6R interaction stimulates TNF- $\alpha$  production <sup>37</sup> whereas it is usually accepted that TNF- $\alpha$  activates the production of IL-6 <sup>39</sup>, after the stimulation of TNFR1, a relatively ubiquitous TNF receptor <sup>40</sup>. Taking together, IL-6 and sIL-6R are probably strongly expressed in deep periodontal sites <sup>15</sup>: the impact of TCZ at these sites might promote the anti-inflammatory effects of IL-6, thus explaining the reduction of TNF- $\alpha$  concentration in group 2.

Furthermore, at the periodontal site, although significant changes in clinical parameters were observed in groups 1 and 2, no variation in IL-6 was observed in the GCF. This result was expected because the target of TCZ is the receptor of IL-6 (IL-6R), not IL-6 or its production. However, we cannot explain the maintenance of the IL-6 concentration at the same level despite the decreased TNF- $\alpha$  expression, unless this effect is too weak to be detectable and/or IL-6 is predominantly produced by other mechanisms. For the other cytokines analyzed, we did not observe any significant variations. It is possible that despite its effect on the expression of TNF- $\alpha$ , TCZ is not sufficiently potent to influence these other cytokines, and TNF- $\alpha$  could be considered as the most responsive cytokine to TCZ at the periodontal site.

These results are in agreement with Kobayashi and al. which have demonstrated a therapeutic efficacy of TCZ in decreasing the serum TNF- $\alpha$  concentration <sup>30</sup>. Taken together, these observations suggest that TCZ therapy appears to decrease both serum and GCF TNF- $\alpha$  concentrations. Further investigations with a larger sample may confirm these preliminary results.

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

The lack of variations in the bacterial load, periopathogen percentage and clinical diagnosis according to the Eke and Page classification <sup>33</sup> could be clearly explained by the same hygiene conditions being maintained during the study and by the fact that IL-6 and TNF- $\alpha$  are not the only factors involved in the inflammatory process. Furthermore, these findings support a major role of bacterial complexes in the initiation and development of the inflammatory response, in contrast to what Van Dyke suggested in 2009, i.e., that the host inflammatory response might dictate biofilm composition <sup>41</sup>. Indeed, our results showed that the significant reduction in GCF TNF- $\alpha$  levels did not cause a significant change in the bacterial composition. On the other hand, multiple inflammatory signaling pathways exist, and we can suggest that the IL-6 blockade is responsible for the development of other compensatory pathways (e.g., IL-1 $\beta$ , IL-17/IL-23). Interestingly, it was demonstrated a synergism between IL-1 $\beta$  and IL-6, and IL-1 $\beta$  was reported to induce the expression of gp130, notably implicated in the protein complex formed with sIL-6R <sup>42</sup>.

Moreover, according to Pers et al., anti TNF- $\alpha$  immunotherapies result in increased gingival inflammation and exert a protective effect on alveolar bone resorption in periodontitis and RA patients <sup>43</sup>, while Mayer et al. observed that RA patients receiving anti-TNF- $\alpha$  medication had lower periodontal indices and GCF TNF- $\alpha$  levels <sup>44</sup>. Thus, they concluded that the suppression of pro-inflammatory cytokines might be beneficial for suppressing periodontal diseases. Hence, alveolar bone resorption could be blocked by anti-IL-6R therapy <sup>45</sup> via the IL-6 and TNF- $\alpha$  pathways <sup>40</sup>.

Within the limitations of this study due to the small number of patients, we can conclude that the systemic treatment of RA with TCZ has a significant beneficial effect on the periodontal clinical parameters and mediators of inflammation, particularly on the reduction in the GCF TNF- $\alpha$  concentration. Further studies are necessary to confirm the effect of IL-6R blockade on periodontitis and the generalizability of our findings in larger

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

groups of patients.

**Disclosure of Interest:** The authors declares that they have no competing interest.

**Funding:** The work was supported by the PHRC GIRCI Grand Ouest, Direction de la recherche Clinique, CHU,Nantes, France [Eudract 2012-002931-27, RC12\_0172 14].

**Acknowledgments:**

We thank Véronique Duperier-Le Gac and Marjorie Chéraud-Carpentier, clinical research technicians, for their contributions to this work.

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*



**References**

- 1 de Pablo, P., Dietrich, T. & McAlindon, T. E. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol* **35**, 70-76 (2008).
- 2 Mercado, F. B., Marshall, R. I., Klestov, A. C. & Bartold, P. M. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol* **72**, 779-787, doi:10.1902/jop.2001.72.6.779 (2001).
- 3 Marotte, H. *et al.* The association between periodontal disease and joint destruction in rheumatoid arthritis extends the link between the HLA-DR shared epitope and severity of bone destruction. *Ann Rheum Dis* **65**, 905-909, doi:10.1136/ard.2005.036913 (2006).
- 4 Stein, J., Reichert, S., Gautsch, A. & Machulla, H. K. Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis? *J Periodontal Res* **38**, 508-517 (2003).
- 5 Contreras, A. *et al.* Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol* **70**, 478-484, doi:10.1902/jop.1999.70.5.478 (1999).
- 6 Slots, J., Kamma, J. J. & Sugar, C. The herpesvirus-Porphyromonas gingivalis-periodontitis axis. *J Periodontal Res* **38**, 318-323 (2003).
- 7 Martinez-Martinez, R. E. *et al.* Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol* **36**, 1004-1010, doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01496.x (2009).

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

- 8 Berglundh, T., Donati, M. & Zitzmann, N. B cells in periodontitis: friends or enemies? *Periodontol 2000* **45**, 51-66, doi:10.1111/j.1600-0757.2007.00223.x (2007).
- 9 Rosenstein, E. D., Greenwald, R. A., Kushner, L. J. & Weissmann, G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* **28**, 311-318, doi:10.1007/s10753-004-6641-z (2004).
- 10 Harvey, G. P. *et al.* Expression of peptidylarginine deiminase-2 and -4, citrullinated proteins and anti-citrullinated protein antibodies in human gingiva. *J Periodontal Res* **48**, 252-261, doi:10.1111/jre.12002 (2013).
- 11 McInnes, I. B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* **7**, 429-442, doi:10.1038/nri2094 (2007).
- 12 Nibali, L., Fedele, S., D'Aiuto, F. & Donos, N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis* **18**, 236-243, doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01867.x (2012).
- 13 Graves, D. T. & Cochran, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* **74**, 391-401, doi:10.1902/jop.2003.74.3.391 (2003).
- 14 Takahashi, K. *et al.* Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* **65**, 147-153, doi:10.1902/jop.1994.65.2.147 (1994).
- 15 Chen, X. T., Tan, J. Y., Lei, L. H. & Chen, L. L. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis. *Am J Dent* **28**, 9-12 (2015).
- 16 Lee, H. J., Kang, I. K., Chung, C. P. & Choi, S. M. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* **22**, 885-890 (1995).

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

- 17 Shimada, Y. *et al.* The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *J Periodontol* **81**, 1118-1123, doi:10.1902/jop.2010.090741 (2010).
- 18 Vidal, F., Figueredo, C. M., Cordovil, I. & Fischer, R. G. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *J Periodontol* **80**, 786-791, doi:10.1902/jop.2009.080471 (2009).
- 19 Bozkurt, F. Y., Berker, E., Akkus, S. & Bulut, S. Relationship between interleukin-6 levels in gingival crevicular fluid and periodontal status in patients with rheumatoid arthritis and adult periodontitis. *J Periodontol* **71**, 1756-1760, doi:10.1902/jop.2000.71.11.1756 (2000).
- 20 Baillet, A. *et al.* Evaluation of serum interleukin-6 level as a surrogate marker of synovial inflammation and as a factor of structural progression in early rheumatoid arthritis: results from a French national multicenter cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **67**, 905-912, doi:10.1002/acr.22513 (2015).
- 21 Scott, L. J. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* **77**, 1865-1879, doi:10.1007/s40265-017-0829-7 (2017).
- 22 Nishimoto, N. & Kishimoto, T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol*, 151-160, doi:10.1007/978-3-540-73259-4\_7 (2008).
- 23 Calabrese, L. H. & Rose-John, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 720-727, doi:10.1038/nrrheum.2014.127 (2014).

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

- 24 Hunter, C. A. & Jones, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* **16**, 448-457, doi:10.1038/ni.3153 (2015).
- 25 Maini, R. N. *et al.* Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum* **54**, 2817-2829, doi:10.1002/art.22033 (2006).
- 26 Smolen, J. S. *et al.* Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* **371**, 987-997, doi:10.1016/S0140-6736(08)60453-5 (2008).
- 27 Nishimoto, N. *et al.* Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol* **19**, 12-19, doi:10.1007/s10165-008-0125-1 (2009).
- 28 Nishimoto, N. *et al.* Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. *Ann Rheum Dis* **66**, 1162-1167, doi:10.1136/ard.2006.068064 (2007).
- 29 Kobayashi, T. *et al.* Assessment of interleukin-6 receptor inhibition therapy on periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol* **85**, 57-67, doi:10.1902/jop.2013.120696 (2014).
- 30 Kobayashi, T. *et al.* Interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab ameliorates periodontal inflammation in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis as *Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

well as tumor necrosis factor inhibitors. *Clinical and Experimental Dental Research* **1**, 63-73, doi:10.1002/cre2.11 (2015).

- 31 Arnett, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**, 315-324 (1988).
- 32 Inoue, E., Yamanaka, H., Hara, M., Tomatsu, T. & Kamatani, N. Comparison of Disease Activity Score (DAS)28- erythrocyte sedimentation rate and DAS28- C-reactive protein threshold values. *Ann Rheum Dis* **66**, 407-409, doi:10.1136/ard.2006.054205 (2007).
- 33 Eke, P. I., Page, R. C., Wei, L., Thornton-Evans, G. & Genco, R. J. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* **83**, 1449-1454, doi:10.1902/jop.2012.110664 (2012).
- 34 Bostanci, N. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE) levels in periodontal diseases. *J Dent Res* **87**, 273-277 (2008).
- 35 Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Goodson, J. M. & Lindhe, J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* **11**, 21-32 (1984).
- 36 Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 878-888, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034 (2011).
- 37 Hong, S. S. *et al.* A Novel Small-Molecule Inhibitor Targeting the IL-6 Receptor beta Subunit, Glycoprotein 130. *J Immunol* **195**, 237-245, doi:10.4049/jimmunol.1402908 (2015).

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

- 38 Diaz-Torne, C. *et al.* The combination of IL-6 and its soluble receptor is associated with the response of rheumatoid arthritis patients to tocilizumab. *Semin Arthritis Rheum*, doi:10.1016/j.semarthrit.2017.10.022 (2017).
- 39 Kozawa, O., Suzuki, A., Kaida, T., Tokuda, H. & Uematsu, T. Tumor necrosis factor- $\alpha$  autoregulates interleukin-6 synthesis via activation of protein kinase C. Function of sphingosine 1-phosphate and phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J Biol Chem* **272**, 25099-25104 (1997).
- 40 Monaco, C., Nanchahal, J., Taylor, P. & Feldmann, M. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol* **27**, 55-62, doi:10.1093/intimm/dxu102 (2015).
- 41 Van Dyke, T. E. The etiology and pathogenesis of periodontitis revisited. *J Appl Oral Sci* **17** (2009).
- 42 Sawada, S., Chosa, N., Ishisaki, A. & Naruishi, K. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 $\beta$  and IL-6. *Biomed Res* **34**, 31-40 (2013).
- 43 Pers, J. O., Saraux, A., Pierre, R. & Youinou, P. Anti-TNF- $\alpha$  immunotherapy is associated with increased gingival inflammation without clinical attachment loss in subjects with rheumatoid arthritis. *J Periodontol* **79**, 1645-1651, doi:10.1902/jop.2008.070616 (2008).
- 44 Mayer, Y., Balbir-Gurman, A. & Machtei, E. E. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy and periodontal parameters in patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol* **80**, 1414-1420, doi:10.1902/jop.2009.090015 (2009).
- 45 Axmann, R. *et al.* Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* **60**, 2747-2756, doi:10.1002/art.24781 (2009).

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

*Tocilizumab reduce TNF- $\alpha$  GCF concentration in periodontitis*

Table 1.1: Characteristics of patients: age, gender, rheumatologic diagnosis and periodontal diagnosis at M0 and M6.

| Subject                 |    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|-------------------------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Genre (m/w)             |    | w    | m    | w    | m    | w    | w    | w    | m    | w    | w    | w    | m    |
| Age                     |    | 62   | 38   | 30   | 53   | 68   | 56   | 66   | 42   | 79   | 35   | 55   | 50   |
| Rheumatologic diagnosis |    | RA   | RA   | RA   | RA   | RA   | RA   | RA   | RA   | RA   | RA   | RA   | RA   |
| Duration Of RA          |    | 2003 | 2006 | 2004 | 2001 | 1989 | 1992 | 2010 | 2009 | 1980 | 2001 | 1996 | 2008 |
| CS DMARDS               |    | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  |
| Prednisolone            |    | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  | NO   | YES  | NO   | NO   | YES  | YES  | YES  |
| Methothrexate           |    | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  | NO   | NO   | YES  | YES  | YES  | YES  | YES  |
| Tabac (Py)              |    | 0    | 0    | 0    | 10   | 0    | 28,5 | 0    | 1,5  | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Periodontal Diagnosis   | M0 | SP   | MP   | MP   | SP   | SP   | MP   | MP   | MP   | MP   | mP   | mP   | MP   |
| (Page&Ecke)             | M6 | SP   | MP   | MP   | SP   | SP   | SP   | MP   | MP   | MP   | mP   | mP   | MP   |

SP: Severe Periodontitis ; MP: Moderate Periodontitis ; mP: Mild Periodontitis ; RA : Rheumatoid Arthritis; PY: Pack-year



Table 1.2: Evolutions of pathological parameters of rheumatoid arthritis and periodontitis at Day 0 and M6. \*=significant differences, Wilcoxon signed-rank test.

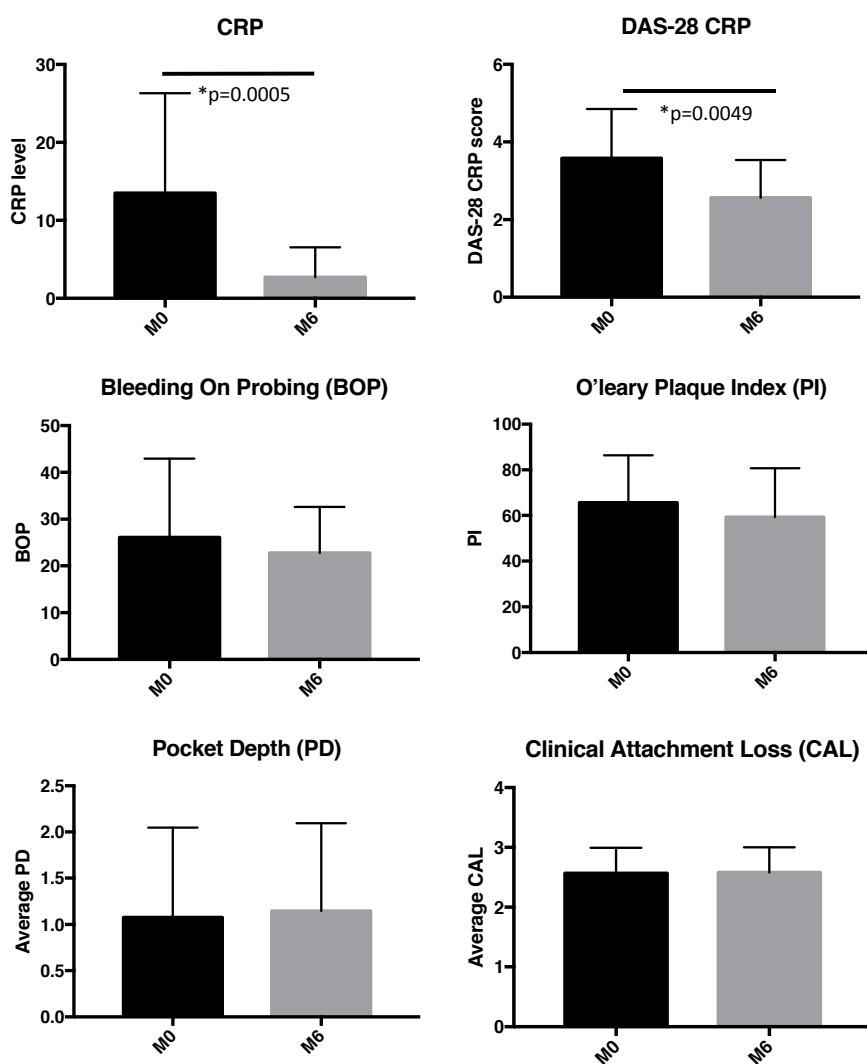


Table 2: Evolutions of clinical criteria between M0 and M6 were compared between the 3 groups; group 0 was considered the reference (total number of periodontal sites measured 1594). General linear mixed models (GLMMs) were used to analyze the evolutions of the clinical indexes and parameters. \*: significant differences. □: group 0 for reference.

|           |               | Estimate | Std. Error | p-value<br>GLMM |
|-----------|---------------|----------|------------|-----------------|
| CAL_Delta | (Intercept) □ | 0.61941  | 0.09449    | 3.31E-05        |
|           | Group 1       | -0.89705 | 0.06744    | < 2e-16*        |
|           | Group 2       | -2.13671 | 0.09616    | < 2e-16*        |
| PD_Delta  | (Intercept)   | 0.5448   | 0.1148     | 0.000696        |
|           | Group 1       | -0.5593  | 0.0457     | < 2e-16*        |
|           | Group 2       | -2.0447  | 0.065      | < 2e-16*        |
| BOP_Delta | (Intercept)   | 0.02266  | 0.03367    | 0.514           |
|           | Group 1       | -0.0287  | 0.02396    | 0.231           |
|           | Group 2       | -0.23812 | 0.03451    | < 2e-16*        |

Table 3: Individual score evolution of gingival fluid volume between M0 and M6. The averages of the samples of each patient were compared at M0 and M6 (n=48). (p-value = 0.0673).

| <b>Individual patient mean gingival<br/>fluid volume/<math>\mu</math>l Day 0</b> | <b>Individual patient mean gingival<br/>fluid volume/<math>\mu</math>l M6</b> | <b>Differences<br/>M6-Day 0</b> |
|--|---|---------------------------------|
| 0.524  | 0.409   | -0.11                           |
| 0.99   | 1.199   | 0.21                            |
| 1.063  | 0.488   | -0.57                           |
| 0.896  | 0.443   | -0.45                           |
| 0.909  | 1.096   | 0.19                            |
| 0.782  | 0.391   | -0.39                           |
| 0.74   | 0.506   | -0.23                           |
| 0.567  | 0.458   | -0.11                           |
| 1.268  | 0.436   | -0.83                           |
| 0.712  | 0.836   | 0.12                            |
| 0.598  | 0.373   | -0.22                           |
| 0.823  | 0.603   | Mean                            |
| 0.229  | 0.297   | SD                              |

Table 4: Evolutions of 9 cytokines between M0 and M6 compared between the 3 groups of sites (n=48). No differences were found, except for TNF- $\alpha$  for which a statistical difference (p = 0.04225) was found between group 2 and reference group. \*: significant differences.

|               |             |          |            | p-value  |
|---------------|-------------|----------|------------|----------|
|               |             | Estimate | Std. error | GLMM     |
| IL-1          | (Intercept) | -10.12   | 70.94      | 0.888    |
|               | Group 1     | -120.6   | 86.68      | 0.174    |
|               | Group 2     | 19.79    | 80         | 0.806    |
| IL-6          | (Intercept) | 0.9224   | 0.4775     | 0.0635   |
|               | Group 1     | 0.1892   | 0.6241     | 0.7638   |
|               | Group 2     | -0.5329  | 0.6112     | 0.3891   |
| IL-7          | (Intercept) | 1.5098   | 0.7595     | 0.0565   |
|               | Group 1     | 0.5382   | 0.9826     | 0.5873   |
|               | Group 2     | -1.2305  | 0.9111     | 0.186    |
| IL-8          | (Intercept) | 259.04   | 130.42     | 0.0577   |
|               | Group 1     | 61.01    | 171.14     | 0.7239   |
|               | Group 2     | -211.6   | 167.31     | 0.2154   |
| IL-10         | (Intercept) | 0.2652   | 2.293      | 0.911    |
|               | Group 1     | 2.8131   | 2.4369     | 0.305    |
|               | Group 2     | -0.4346  | 2.7096     | 0.877    |
| IL-13         | (Intercept) | 0.087804 | 0.090288   | 0.375    |
|               | Group 1     | NA       | NA         | NA       |
|               | Group 2     | 0.005859 | 0.10683    | 0.958    |
| TNF- $\alpha$ | (Intercept) | 2.3013   | 0.6823     | 0.00344  |
|               | Group 1     | -1.1819  | 1.0326     | 0.26591  |
|               | Group 2     | -2.0081  | 0.924      | 0.04225* |

Table 5: Microbiological evolutions of (Aa, Fn, Pg, Pi, Td and Tf) between M0 and M6 compared between the 3 groups of sites (n=48). No statistical differences were found.

|                        |             |           |            | t-value | p-value |
|------------------------|-------------|-----------|------------|---------|---------|
|                        |             | Estimate  | Std. error | GLMN    | GLMN    |
| Variations M6-M0 of Aa | (Intercept) | -46.36    | 34017.95   | -0.001  | 1.00    |
|                        | Group 1     | -60596.97 | 44786.71   | -1.353  | 0.18    |
|                        | Group 2     | 4468.86   | 44190.61   | 0.101   | 0.92    |
| Variations M6-M0 of Fn | (Intercept) | -2599     | 69193      | -0.038  | 0.48    |
|                        | Group 1     | -57804    | 91097      | -0.634  | 0.26    |
|                        | Group 2     | 48070     | 89884      | 0.535   | 0.30    |
| Variations M6-M0 of Pg | (Intercept) | 3.46E+01  | 9.42E+05   | 0       | 1.00    |
|                        | Group 1     | 7.48E+05  | 1.24E+06   | 0.603   | 0.55    |
|                        | Group 2     | 1.61E+06  | 1.22E+06   | 1.313   | 0.19    |
| Variations M6-M0 of Pi | (Intercept) | 10964     | 113011     | 0.097   | 0.46    |
|                        | Group 1     | 63831     | 148019     | 0.431   | 0.33    |
|                        | Group 2     | -151038   | 144377     | -1.046  | 0.15    |
| Variations M6-M0 of Td | (Intercept) | 2244      | 1231351    | 0.002   | 1.00    |
|                        | Group 1     | -77957    | 1621149    | -0.048  | 0.96    |
|                        | Group 2     | 1645302   | 1599572    | 1.029   | 0.30    |
| Variations M6-M0 of Tf | (Intercept) | 89489     | 379890     | 0.236   | 0.41    |
|                        | Group 1     | -38868    | 494725     | -0.079  | 0.47    |
|                        | Group 2     | 625673    | 478368     | 1.308   | 0.10    |

No statistical differences were found.

## Résumé article 2

Dans cet article nous avons étudié les effets du TCZ sur le parodonte sain et pathologique. Il s'agit d'une étude multicentrique entre Nantes et Brest qui a fait l'objet d'un financement par un PHRC interrégional (Annexe 2). Cette étude représente donc une étude pilote sur 12 patients suivis sur 6 mois, avant et après injection de TCZ, sans traitement parodontal. Un charting complet (sondage des poches parodontales, des récessions, des pertes d'attaches et relevé des indices parodontaux) des patients ainsi qu'un suivi de l'évolution de 7 cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13 et TNF- $\alpha$ ) dans le fluide sulculaire ont été réalisés avant puis 6 mois après l'instauration du TCZ. L'étude n'a pas mis en évidence de modifications cliniques chez les patients après 6 mois de TCZ, mais une amélioration de certains paramètres biologiques. Une analyse par site a été effectuée et 3 groupes de sites ont été défini : le group 0 (pas de poche parodontale, pas de perte d'attache), considéré comme sain, ou groupe de reference, le group 1 (CAL > 0 mm, PD  $\leq$  4 mm) incluant les récessions, sans poche parodontale (récession sans inflammation), et le group 2 incluant les sites avec perte d'attache et poche parodontale (CAL > 0 mm, PD  $\geq$  5 mm, avec ou sans récession), correspondant au groupe parothologique. Une diminution significative du TNF- $\alpha$  dans le fluide sulculaire est observée dans le groupe 2, après traitement par TCZ.

# Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis

Juliette Coat<sup>1,2</sup>, Julien Demoersman<sup>1,2</sup>, Sébastien Beuzit<sup>3</sup>, Divi Cornec<sup>1,2,4</sup>, Valérie Devauchelle-Pensec<sup>1,2,4</sup>, Alain Saraux<sup>1,2,4</sup> and Jacques-Olivier Pers<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>EA2216, INSERM ESPRI, ERI29, Université de Brest, Brest, France; <sup>2</sup>LabEx IGO, Brest, France; <sup>3</sup>Department of Dentistry, Brest University Medical School Hospital, Brest, France; <sup>4</sup>Department of Rheumatology, Brest University Medical School Hospital, Brest, France

Coat J, Demoersman J, Beuzit S, Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Pers J-O. Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. J Clin Periodontol 2015; 42: 817–823. doi: 10.1111/jcpe.12433

## Abstract

**Aim:** Rheumatoid arthritis (RA) and periodontitis present many similar features. The benefits of anti-B lymphocyte therapy (rituximab) on reducing tissue resorption in RA prompted us to assess its potential efficacy on the periodontal status of patients with RA treated with rituximab.

**Materials and Methods:** Periodontal status was assessed in 21 subjects with RA, divided into two groups: Group I consisted in 11 subjects assessed before their first infusion of rituximab and again 6 months later. Five of them were also assessed for up to 4 years after their first rituximab infusion. The 10 subjects in group II had received more than two courses of two rituximab infusions at the time of periodontal assessment.

**Results:** Pocket depth and attachment loss were significantly decreased 6 months after treatment with rituximab in group I. The periodontal status of the five subjects from group I followed for up to 48 months after rituximab treatment was improved irrespective of the clinical parameter observed. Patients from group II had a better periodontal status than patients from group I before treatment with rituximab.

**Conclusions:** Anti-B lymphocyte therapy could be beneficial to improve periodontitis suggesting a major role of B cells in this disease.

Key words: anti-B lymphocyte; bone resorption; immunotherapy; periodontitis; rheumatoid arthritis

Accepted for publication 16 July 2015

Links between periodontitis and rheumatoid arthritis (RA) have recently been highlighted (Berthelot & Le Goff 2010). Periodontitis is

characterized by soft and hard tissue destruction around teeth, ultimately leading to tooth loss, whereas RA is characterized by destruction of cartilage and bone in the joints, mediated by similar bone-resorptive cytokines and proteinases (Kaur et al. 2013). Periodontitis is twice as common and twice as severe in patients with RA than in those without RA, and

RA patients are twice as likely to suffer tooth loss (de Pablo et al. 2008). The clinical and radiological severity of periodontitis correlate with those of RA (Mercado et al. 2001, Marotte et al. 2006) and risks for both conditions include HLA-DRB1-04 (Stein et al. 2003, Marotte et al. 2006), smoking (van Winkelhoff et al. 2001) and Epstein-Barr

## Conflict of interest and sources of funding statement

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

virus and cytomegalovirus infection (Contreras et al. 1999, Slots et al. 2003). Furthermore, excessive amounts of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) – the only bacterium in the oral flora that contains a peptidyl-arginine deiminase enzyme (PAD) – are present in the gums of patients with periodontitis (Berglundh et al. 2007) and in the synovial membrane of patients with RA (Martinez-Martinez et al. 2009). However, most of the theories of the connection between periodontitis and RA do not require the presence of *P. gingivalis* in synovium. PAD may promote citrullination of various self-antigens (Rosenstein et al. 2004) and anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs), which constitute the most common autoantibodies in RA, (Besada et al. 2012) are found to be present in the gingival crevicular fluid originating from inflamed gingival tissue (Harvey et al. 2013). Remarkably, two studies (Havemose-Poulsen et al. 2006, Hendler et al. 2010) reported that the incidence of ACPAs is higher in patients with severe periodontitis.

In addition, the mechanism underlying alveolar resorption in periodontitis is similar to the mechanism involved in joint erosion in RA. Consequently, a key role has been attributed to B cells and plasma cells in chronic inflammation of gingival and synovial tissues. Gingival tissue affected with periodontitis contains a larger proportion of B cells than T cells (Berglundh et al. 2007). B-cell over-activity may have detrimental effects on the periodontium (Nakajima et al. 2008), as B cells are the most effective cells in presenting antigens to T cells in gingival tissue affected with periodontitis (Berglundh et al. 2007). This antigen presentation may cause the excessive release of RANK-L or cytokines able to promote osteoclastogenesis (Berthelot & Le Goff 2010). The severity of periodontal disease also correlates with RANK-L and osteoprotegerin over-expression and more strongly with the RANK-L/osteoprotegerin ratio (Bostanci et al. 2007). In human gingival tissue, only 20% of B and T cells express RANK-L in normal individuals, compared with 50% of T cells and up to 90% of B cells in patients with periodontitis (Kawai et al.

2006). Finally, B cells may also stimulate osteoclasts via other pathways, such as IL-17 over-secretion, with up-regulation by IL-6 (Colucci et al. 2005).

Overall, these observations suggest that the impact of anti-B cell therapy on periodontal disease may be worthy of investigation. We thus examined the possibility that treatment of RA with rituximab may offer an opportunity to determine its effects on periodontitis.

## Materials and Methods

### Subjects

Twenty-one subjects with RA, meeting the American College of Rheumatology criteria for RA (Arnett et al. 1988), were enrolled in this study, conducted at Brest University Hospital, Brest, France, between June 2009 and October 2013. Informed consent was obtained from all subjects prior to their inclusion, and the study protocol was approved by the Institutional Review Board at the Brest University hospital (2010-A00232-37/1). A cross-sectional and longitudinal analysis of the effects of rituximab was performed. Each rituximab course consisted in two 1000 mg infusions 2 weeks apart, with concomitant 100 mg methyl-prednisolone infusion to avoid immediate reactions, as recommended in clinical practice. To assess the effect of long-term treatment on periodontal status (cross-sectional analysis), the subjects were divided into two groups. Group I (Table 1) included four male and seven female subjects ranging in age from 47 to 80 years (mean age:  $60.8 \pm 9.1$  years) who had not received rituximab therapy when their periodontal status was first assessed. They were all receiving methotrexate (MTX) at the time. Among group I patients, eight received rituximab after one or more anti-TNF drug failure, two received also tocilizumab or abatacept before rituximab (one each), and one received rituximab after MTX failure. Therefore, 8/11 patients were receiving anti-TNF drugs just before their first rituximab infusion. The periodontal status of group I was assessed on the day they attended the clinic for the first

rituximab infusion and 6 months later for their control appointment. We observed a slight decrease in the modified RA disease activity score in 28 joints (DAS-28) between M0 and M6 (mean DAS-28  $3.8 \pm 1.4$  at baseline versus  $3.3 \pm 0.9$  at M6), but not significant ( $p = 0.24$ ). However, some patients experienced greater improvement at earlier timepoints and received a second rituximab course at M6 for a RA activity flare. Then five subjects from group I were followed for up to 48 months (mean  $38.4 \pm 10.1$  months), receiving at least two further rituximab courses (mean  $4.6 \pm 2.1$  courses), and their periodontal status was reassessed. Group II (Table 1) included two male and eight female subjects ranging in age from 51 to 83 years (mean age:  $63.2 \pm 9.6$  years). This group had received rituximab courses at least twice (from 2 to 8 courses, mean  $4.6 \pm 1.9$ ). Eight subjects from this group (80%) received MTX with rituximab from the outset. At the time of the first dental examination, there were no differences between the groups with respect to their DAS-28:  $3.8 \pm 1.4$  versus  $3.4 \pm 1.2$  in group I and II respectively.

### Dental and periodontal assessment

Decayed, missing and filled teeth (DMFT) and removable or fixed prosthetic appliances were assessed. All participants were questioned about their oral hygiene, smoking status and the frequency of dental visits per year.

All clinical examinations were routinely performed by the same examiner (JC) without knowing the group status. As previously described (Pers et al. 2005) the whole-mouth clinical periodontal parameters, including plaque index (PI), modified gingival index (MGI), papillary bleeding index (PBI), attachment loss (AL) and pocket depth (PD), were determined at six sites per tooth (mesio-buccal, mid-buccal, mesio-lingual, mid-lingual and disto-lingual). PD was defined as the distance in mm from the most coronal portion of the free gingival margin to the most apical penetration of the constant pressure probe. AL was defined as the distance in mm from the cemento-enamel junction to the most apical penetration of the probe.



Table 1. General characteristics and periodontal status of subjects with RA not treated with rituximab (RTX) (Group I) and those having received  $\geq 2$  courses of rituximab (Group II)

|  | Group I<br>( <i>n</i> = 11) | Group II<br>( <i>n</i> = 10) | <i>p</i> |
|--|-----------------------------|------------------------------|----------|
| Age (years; mean $\pm$ SD)                     | 60.8 $\pm$ 9.1              | 63.2 $\pm$ 9.6               | NS       |
| Female, <i>n</i> (%)                           | 7 (64.0)                    | 8 (80.0)                     | NS       |
| Disease duration (years; mean $\pm$ SD)        | 13.0 $\pm$ 10.0             | 15.4 $\pm$ 8.4               | NS       |
| Smoker, <i>n</i> (%)                           | 4 (36.0)                    | 0                            | NS       |
| Positive RF, <i>n</i> (%)                      | 11 (100)                    | 10 (100)                     | NS       |
| Positive ACPA, <i>n</i> (%)                    | 11 (100)                    | 10 (100)                     | NS       |
| Erosions, <i>n</i> (%)                         | 9 (81.8)                    | 9 (90.0)                     | NS       |
| Concomitant MTX, <i>n</i> (%)                  | 11 (100)                    | 8 (80.0)                     | NS       |
| MTX duration (years; mean $\pm$ SD)            | 8.8 (5.9)                   | 2.4 (4.9)                    | NS       |
| MTX dosage (mg; mean $\pm$ SD)                 | 11.9 (4.4)                  | 10.9 (2.8)                   | NS       |
| Concomitant steroids, <i>n</i> (%)             | 8 (72.7)                    | 4 (40.0)                     | 0.05     |
| Steroid dosage (mg; mean $\pm$ SD)             | 8.3 (3.7)                   | 5.3 (0.5)                    | NS       |
| Number of previous biologics (mean $\pm$ SD)   | 1.6 $\pm$ 0.9               | 1.7 $\pm$ 0.9                | NS       |
| Previous TNF-blockers, <i>n</i> (%)            | 10 (90.9)                   | 9 (90.0)                     | NS       |
| Rituximab courses (mean $\pm$ SD)              | 0                           | 4.6 $\pm$ 1.9                | /        |
| Years since first RTX infusion (mean $\pm$ SD) | /                           | 3.4 $\pm$ 1.6                | /        |
| DAS 28 (mean $\pm$ SD)                         | 3.73 $\pm$ 1.37             | 3.35 $\pm$ 1.21              | NS       |
| DMFT (mean $\pm$ SD)                           | 21.0 $\pm$ 4.4              | 21.7 $\pm$ 3.65              | NS       |
| PI (mean $\pm$ SD)                             | 0.90 $\pm$ 0.64             | 1.34 $\pm$ 0.75              | 0.001    |
| MGI (mean $\pm$ SD)                            | 0.57 $\pm$ 0.76             | 0.31 $\pm$ 0.57              | 0.0056   |
| PBI (mean $\pm$ SD)                            | 0.45 $\pm$ 0.34             | 0.27 $\pm$ 0.18              | NS       |
| PD (mm; mean $\pm$ SD)                         | 2.63 $\pm$ 0.73             | 2.06 $\pm$ 0.37              | 0.001    |
| AL (mm; mean $\pm$ SD)                         | 2.90 $\pm$ 0.97             | 2.59 $\pm$ 0.80              | 0.001    |
| CDC/AAP case definition of periodontitis       |                             |                              |          |
| Severe   | 2                           | 2                            |          |
| Moderate                                       | 8                           | 3                            |          |
| Mild   | 1                           | 4                            |          |
| No   | 0                           | 1                            |          |

RF, rheumatoid factor; ACPA, anti-citrullinated peptide antibodies; MTX, methotrexate (ongoing treatment); DAS28, disease activity score; DMFT, decayed, missing, and filled teeth; PI, plaque index; PBI, papillary bleeding index; RA, rheumatoid arthritis; MGI, modified gingival index; PD, pocket depth; AL, attachment loss; F, female. (Mann-Whitney,  $\chi^2$  or Fisher exact tests for unpaired data).

#### Case definition of periodontitis

We have used the definition proposed by the CDC periodontal disease surveillance work group and supported by the American academy of Periodontology to define severity of periodontitis (Eke et al. 2012).

Severe periodontitis was defined as the presence of two or more interproximal sites with  $\geq 6$  mm AL (not on the same tooth) and one or more interproximal site(s) with  $\geq 5$  mm PD. Moderate periodontitis, among those who did not meet severe periodontitis case definition, was defined as two or more interproximal sites with  $\geq 4$  mm clinical AL (not as the same tooth) or two or more were interproximal sites with PD  $\geq 5$  mm, also not on the same tooth. Mild periodontitis, among those who met neither the severe nor moderate periodontitis case definition, was defined as  $\geq 2$  interproximal sites with  $\geq 3$  mm AL and  $\geq 2$  interproximal sites with  $\geq 4$  mm PD (not on the

same tooth) or one site with  $\geq 5$  mm PD.

#### Statistical analysis

A mean  $\pm$  standard deviation (SD) per subject was obtained for each index. Results were expressed as the arithmetic mean  $\pm$  SD and compared using the Mann-Whitney *U*-test for unpaired data. Categorical data were compared using  $\chi^2$  or Fisher exact tests as appropriate. Comparisons between baseline data and data at the 6-month follow-up were made using the Wilcoxon test for paired data. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software.  $p < 0.05$  were considered significant.

#### Results

##### Cross-sectional analysis

Ten of the 11 subjects from group I and all the subjects from group II

brushed their teeth twice daily ( $p =$  non-significant [NS]). The number of visits to the dentist per year was comparable in both groups.

The mean DMFT score per subject was  $21.0 \pm 4.4$  in group I and  $21.7 \pm 3.6$  in the rituximab-treated group II ( $p =$  NS; Table 1). In group I, 6 months after rituximab treatment, no change in this DMFT index was observed.

The severity of periodontitis seemed to be increased in group I patients (two patients with severe periodontitis, eight patients with moderate periodontitis and one patient with mild periodontitis) compared to group II patients (two patients with severe periodontitis, three with moderate periodontitis, four with mild periodontitis and one without periodontitis) (Table 1).

Regarding gingival inflammation in subjects from groups I and II in Table 1, PBI was slightly but not significantly lower in group II patients ( $0.45 \pm 0.34$  in group I versus  $0.27 \pm 0.18$  in group II, NS). However, analysis of the MGI revealed that subjects in the rituximab-treated group II appeared to have fewer signs of gingivitis ( $0.57 \pm 0.76$  in group I versus  $0.31 \pm 0.57$  in group II,  $p < 0.006$ ). Furthermore, a lower PD and AL were observed in group II patients compared to group I untreated patients (PD:  $2.63 \pm 0.73$  versus  $2.06 \pm 0.37$ ,  $p < 0.001$  and AL:  $2.59 \pm 0.8$  versus  $2.9 \pm 0.97$ ,  $p < 0.001$  respectively). Hence, subjects treated with rituximab over the long term compared to subjects not treated with rituximab present improvements in their periodontal status. These findings imply that rituximab may be responsible for delaying bone damage and are particularly surprising given that the plaque index was lower in group I than in group II ( $0.90 \pm 0.64$  versus  $1.34 \pm 0.75$ ,  $p < 0.001$ ).

##### Longitudinal analysis

The 11 subjects from group I were followed for 6 months after their first rituximab infusion (Table 2). When their periodontal status was reassessed 6 months after rituximab treatment (Fig. 1), MGI was not significantly modified ( $0.57 \pm 0.76$  before treatment versus  $0.50 \pm 0.54$

Table 2. Individual characteristics and periodontal status of subjects with RA in group I before and 6 months after rituximab treatment

| Subject | Age | Gender | DAS28 |      | DMFT | PI          |               | PBI         |               | MGI         |             | PD (mm)     |                | AL (mm)     |                | CDC/AAP case definition |
|---------|-----|--------|-------|------|------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------------------|
|         |     |        | M0    | M6   |      | M0          | M6            | M0          | M6            | M0          | M6          | M0          | M6             | M0          | M6             |                         |
| 1       | 68  | F      | 5.49  | 4.02 | 15   | 0.25 ± 0.76 | 0.44 ± 0.8    | 0.61 ± 0.93 | 0.30 ± 0.67   | 0.33 ± 0.68 | 0.48 ± 0.75 | 2.79 ± 1.02 | 2.46 ± 0.94*** | 3.11 ± 0.62 | 2.83 ± 0.76**  | Moderate                |
| 2       | 67  | F      | 3.57  | 2.57 | 22   | 0.04 ± 0.21 | 0.95 ± 1.33** | 0.30 ± 0.70 | 0.95 ± 1.02   | 0 ± 0       | 0.87 ± 0.63 | 2.88 ± 0.73 | 2.72 ± 0.78*   | 3.07 ± 0.75 | 2.85 ± 0.72**  | Moderate                |
| 3       | 54  | M      | 5.99  | 3.26 | 21   | 0.17 ± 0.38 | 0.48 ± 0.83*  | 0.24 ± 0.58 | 0.07 ± 0.26   | 0.07 ± 0.37 | 0.41 ± 0.73 | 2.29 ± 0.49 | 2.25 ± 0.43    | 2.38 ± 0.35 | 2.42 ± 0.49    | Mild                    |
| 4       | 64  | F      | 3.30  | 4.00 | 25   | 1.05 ± 1.05 | 1.32 ± 0.48   | 1.27 ± 1.16 | 0.45 ± 0.86** | 1.77 ± 0.61 | 1 ± 0*      | 3.42 ± 1.43 | 2.88 ± 1.52*** | 4.00 ± 1.13 | 3.37 ± 1.56*** | Severe                  |
| 5       | 64  | F      | 4.28  | 4.60 | 20   | 0.81 ± 0.78 | 1.17 ± 0.49** | 0.57 ± 1.12 | 0.35 ± 0.71   | 0.78 ± 0.95 | 1.52 ± 0.67 | 2.16 ± 0.37 | 2.17 ± 0.40    | 2.30 ± 0.47 | 2.28 ± 0.35    | Moderate                |
| 6       | 55  | F      | 4.10  | 3.24 | 15   | 1.25 ± 1.07 | 1.54 ± 0.66   | 0.75 ± 0.94 | 0.29 ± 0.86** | 1.46 ± 0.78 | 1.29 ± 0.46 | 2.78 ± 0.77 | 2.07 ± 0.37*** | 2.90 ± 0.51 | 2.14 ± 0.27*** | Moderate                |
| 7       | 64  | F      | 1.87  | 2.14 | 23   | 2.00 ± 0.82 | 2.00 ± 0.82   | 0.18 ± 0.39 | 0.18 ± 0.39   | 0.05 ± 0.21 | 0.04 ± 0.21 | 1.55 ± 0.63 | 1.55 ± 0.63    | 1.72 ± 0.90 | 1.03 ± 0.36    | Moderate                |
| 8       | 67  | F      | 4.84  | 3.66 | 23   | 0.57 ± 0.69 | 0.71 ± 0.38** | 0.14 ± 0.45 | 0.07 ± 0.38   | 0 ± 0       | 0 ± 0       | 2.33 ± 0.67 | 1.79 ± 0.74*** | 2.54 ± 0.50 | 2.05 ± 0.61*** | Moderate                |
| 9       | 47  | M      | 3.96  | 2.68 | 26   | 0.73 ± 0.83 | 0.35 ± 0.69   | 0.04 ± 0.01 | 0.35 ± 0.69*  | 0.10 ± 0.27 | 0.20 ± 0.57 | 2.16 ± 0.71 | 2.35 ± 0.82**  | 2.42 ± 0.60 | 2.58 ± 0.49*   | Moderate                |
| 10      | 52  | M      | 2.7   | 4.01 | 17   | 1.67 ± 1.27 | 1.87 ± 1.1*   | 0.36 ± 0.7  | 0 ± 0         | 0.20 ± 0.41 | 0 ± 0       | 2.66 ± 0.85 | 2.33 ± 0.82*** | 2.66 ± 0.41 | 2.33 ± 0.33*** | Moderate                |
| 11      | 80  | M      | 1.31  | 1.84 | 27   | 1.68 ± 1.44 | 0.60 ± 0.65** | 0.64 ± 0.99 | 0.16 ± 1.18   | 0 ± 0       | 0.20 ± 0.41 | 2.16 ± 1.01 | 2.4 ± 1.22**   | 2.28 ± 0.95 | 2.52 ± 1.16**  | Severe                  |

DAS28, disease activity score; DMFT, decayed, missing, and filled teeth; PI, plaque index; PBI, papillary bleeding index; MGI, modified gingival index; PI-pocket depth; RA, rheumatoid

DAS28, disease activity score; DMFT, decayed, missing, and filled teeth; PI, plaque index; PBI, papillary bleeding index; MGI, modified gingival index; PD, pocket depth; RA, rheumatoid arthritis; AL, attachment loss; F, female; M, male; (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  Wilcoxon test for paired data).

after treatment,  $p = 0.57$ ). PBI was also unchanged after rituximab treatment ( $0.45 \pm 0.34$  before treatment *versus*  $0.35 \pm 0.36$  after treatment,  $p = 0.25$ ) but an improvement in this index was observed in two subjects (Table 2). Consequently, gingival inflammation was slightly decreased 6 months after rituximab treatment in subjects with RA.

However, PD and AL were significantly decreased (Table 2) 6 months after rituximab treatment ( $2.63 \pm 0.73$  before treatment *versus*  $2.4 \pm 0.6$  after treatment,  $p < 0.001$  for PD) and ( $2.9 \pm 0.97$  before treatment *versus*  $2.63 \pm 0.98$  after treatment,  $p < 0.001$  for AL). These findings indicate that inflammation and bone damage are delayed with rituximab treatment. These improvements were not the result of a change in oral hygiene habits because the plaque index was unchanged in group I subjects after rituximab treatment ( $0.90 \pm 0.64$  before treatment *versus*  $0.90 \pm 0.68$  after treatment;  $p = 0.43$ ).

Furthermore, in group I, the two patients with severe periodontitis remained unchanged 6 months after rituximab treatment although the percentage of sites/mouth with AL  $\geq 3$  mm was largely decreased in one patient (patient 4) (Table 3). Among the eight patients with moderate periodontitis, six were unchanged after rituximab treatment although a marked improvement in the percentage of sites with AL  $\geq 3$  mm was observed in five of them. Interestingly, two patients with moderate periodontitis had no periodontitis 6 months after rituximab treatment. Finally, the patient with mild periodontitis was stable 6 months after rituximab treatment (Table 3).

Five subjects from group I were then followed for up to 48 months (mean:  $38.4 \pm 10.1$  months), receiving at least two courses of rituximab (mean:  $4.6 \pm 2.1$  courses). As shown in Fig. 1, their periodontal status continued to improve irrespective of the clinical parameter observed (MGI, PBI, PD or AL). Their periodontal status remained unchanged.

These findings confirm the reduction in inflammation and tissue damage observed in group II and are suggestive of potential early signs of periodontal healing. Consequently, B-cell depletion with rituximab could be effective in the treatment of

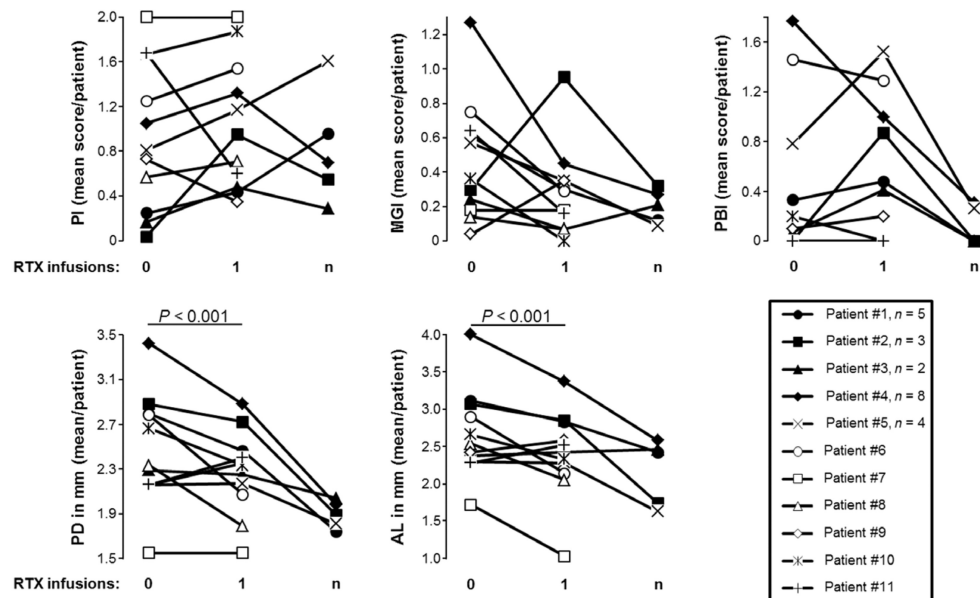


Fig. 1. Periodontal indices (Modified gingival index [MGI], papillary bleeding index [PBI], pocket depth [PD] and attachment loss [AL]) were improved after rituximab (RTX) treatment, despite a stable plaque index (PI). Periodontal indices were assessed in eleven subjects from group I with RA, before (0) and 6 months after the first infusion with RTX (1). Five patients were followed up to 48 months after n (2–8) courses with RTX.

Table 3. Measures of periodontitis of subjects with RA in group I before and after rituximab treatment

| Patients | AL measures (%)               |      |                               |     | PD measures (%)               |      |                               |      |
|----------|-------------------------------|------|-------------------------------|-----|-------------------------------|------|-------------------------------|------|
|          | Sites/month<br>AL $\geq$ 3 mm |      | Sites/month<br>AL $\geq$ 6 mm |     | Sites/month<br>PD $\geq$ 4 mm |      | Sites/month<br>PD $\geq$ 5 mm |      |
|          | M0                            | M6   | M0                            | M6  | M0                            | M6   | M0                            | M6   |
| 1        | 48.6                          | 27.8 | 1.4                           | 1.4 | 15.3                          | 4.2  | 2.8                           | 1.4  |
| 2        | 73.6                          | 52.7 | 0                             | 1.4 | 16.6                          | 15.3 | 2.7                           | 1.1  |
| 3        | 37.5                          | 23.8 | 0                             | 0   | 1.1                           | 0    | 1.1                           | 0    |
| 4        | 82.3                          | 51.4 | 14.7                          | 8.8 | 32.3                          | 25.0 | 16.1                          | 17.6 |
| 5        | 12.5                          | 6.9  | 0                             | 0   | 0                             | 0    | 0                             | 0    |
| 6        | 59.4                          | 6.7  | 4.0                           | 0   | 6.7                           | 0    | 0                             | 0    |
| 7        | 25.0                          | 16.6 | 0                             | 0   | 0                             | 0    | 0                             | 0    |
| 8        | 59.0                          | 30.0 | 3.0                           | 1.0 | 0                             | 0    | 0                             | 0    |
| 9        | 53.5                          | 65.1 | 3.5                           | 1.2 | 0                             | 0    | 0                             | 0    |
| 10       | 61.9                          | 48.8 | 0                             | 1.2 | 28.6                          | 8.3  | 2.4                           | 1.2  |
| 11       | 41.9                          | 50.0 | 2.3                           | 3.5 | 2.3                           | 6.9  | 2.3                           | 4.6  |

AL, attachment loss; PD, pocket depth; RA, rheumatoid arthritis.

periodontal disease as a result of inhibition of inflammation and bone loss.

#### Discussion

The change from a stable to a progressive periodontal bone loss was

associated with increased infiltration of B cells and plasma cells (Seymour et al. 1979, Malberg et al. 1992). The validity of using B cells as a prime therapeutic target in treating chronic inflammatory joint diseases has been abundantly confirmed in

RA. In this study, blockade of B-cells improved disease activity in patients with RA, and gingival inflammation and tissue resorption were reduced. This is even more advantageous because long-standing RA aggravates periodontitis, possibly as a result of the impaired manual dexterity of the subjects (Kasser et al. 1997) resulting in less effective tooth cleaning. However, other authors showed that oral hygiene is equally poor in individuals with or without RA (Mercado et al. 2001, Mayer et al. 2009, Esen et al. 2012).

In 2008, we had published a promising study about the impact of anti-TNF- $\alpha$  treatment on the evolution of periodontitis in RA patients. We showed that although those patients presented more marked gingival inflammation after treatment, there was a reduction in attachment loss, and hence a protective effect on alveolar resorption (Pers et al. 2008). These data indicated that inflammation and destruction constituted two interrelated but separate components of periodontitis in patients with RA

822 Coat et al.

and that TNF- $\alpha$  blockade could be beneficial in the treatment of periodontitis due to inhibition of bone loss. However, the persistence of gingival inflammation suggests that the TNF- $\alpha$  blockade pathway could lead to the development of other pathways able to compensate (IL-6, IL-17/IL-23). Consequently, the increased gingival inflammation observed in group I subjects before rituximab treatment could be due to their previous anti-TNF $\alpha$  immunotherapy.

An indirect comparison of our two studies suggests that better periodontal protection is achieved with rituximab compared to anti-TNF- $\alpha$  immunotherapy. This may be due to the central role played by B lymphocytes in all inflammation processes, in contrast with the TNF- $\alpha$  pathway, which can easily be compensated for by another cytokine.

The role of B cells in the pathogenesis of periodontal disease has also recently been highlighted by the fact that a proliferation-inducing ligand (APRIL) and B-cell activating factor (BAFF) were increased in the gingival crevicular fluid (GCF) of patients with RA and coexisting periodontitis. Furthermore, APRIL and BAFF were correlated with RANK-L levels in GCF (Gumus et al. 2013). Since activation of B cells and antibody production by BAFF have been shown to aggravate auto-immune diseases, it seems reasonable to assume that they may contribute to increased B-cell activity in inflammatory periodontal diseases. We had indeed previously observed that complications of periodontitis in patients with primary Sjögren's syndrome were associated with high levels of BAFF in their saliva compared to levels in xerostomia controls (Pers et al. 2005).

In line with our results, a recent study implied a pathological role of B cells in periodontal disease (Oliver-Bell et al. 2015). In mice infected with *P. gingivalis*, a significant increase in the number of B-cells and an increase in B-cell RANK-L expression were observed, whereas B-cell-deficient  $\mu$ MT mice were found to be protected against *P. gingivalis* infection-induced alveolar bone loss.

Although our results were observed in a specific population of

subjects with RA this is the first study reporting the potential efficacy of rituximab on periodontal manifestations, they suggest that B-cell depletion may regulate gingival inflammation and tissue resorption and could help in the treatment of periodontal disease.

# Acknowledgements

This work has been carried out thanks to the support of the Labex IGO project (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government programme, managed by the French National Research Agency (ANR) Ou "This work was realized in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01".

# References

- Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., Liang, M. H., Luthra, H. S., Medsger, T. A. Jr, Mitchell, D. M., Neustadt, D. H., Pinals, R. S., Schaller, J. G., Sharp, J. T., Wilder, R. L. & Hunder, G. G. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**, 315–324.
- Berglundh, T., Donati, M. & Zitzmann, N. (2007) B cells in periodontitis: friends or enemies? *Periodontology* **45**, 51–66.
- Berthelot, J. M. & Le Goff, B. (2010) Rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Joint Bone Spine* **77**, 537–541.
- Besada, E., Nikolaissen, C. & Nossent, H. (2012) Should rheumatoid factor in rheumatoid arthritis be sent to Davy Jones's Locker? *Scandinavian Journal of Rheumatology* **41**, 85–88.
- Bostanci, N., Ilgenli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Toz, H., Berdeli, A., Atilla, G., McKay, I. J., Hughes, F. J. & Belibasakis, G. N. (2007) Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research* **42**, 287–293.
- Colucci, S., Mori, G., Brunetti, G., Coricciati, M., Pignataro, P., Oranger, A., Cirulli, N., Mastrangelo, F., Grassi, F. R. & Grano, M. (2005) Interleukin-7 production by B lymphocytes affects the T cell-dependent osteoclast formation in an *in vitro* model derived from human periodontitis patients. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **18**, 13–19.
- Contreras, A., Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Morrison, J. L. & Slots, J. (1999) Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology* **70**, 478–484.
- Eke, P. I., Page, R. C., Wei, L., Thornton-Evans, G. & Genco, R. J. (2012) Update of the case definitions for population-based surveillance of

- periodontitis. *Journal of Periodontology* **83**, 1449–1454.
- Esen, C., Alkan, B. A., Kirnap, M., Akgul, O., Isikoglu, S. & Erel, O. (2012) The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *Journal of Periodontology* **83**, 773–779.
- Gumus, P., Buduneli, E., Biyikoglu, B., Aksu, K., Sarac, F., Buduneli, N. & Lappin, D. F. (2013) Gingival crevicular fluid and serum levels of APRIL, BAFF and TNF-alpha in rheumatoid arthritis and osteoporosis patients with periodontal disease. *Archives of Oral Biology* **58**, 1302–1308.
- Harvey, G. P., Fitzsimmons, T. R., Dhamarpatni, A. A., Marchant, C., Haynes, D. R. & Bartold, P. M. (2013) Expression of peptidylarginine deiminase-2 and -4, citrullinated proteins and anti-citrullinated protein antibodies in human gingiva. *Journal of Periodontal Research* **48**, 252–261.
- Havemose-Poulsen, A., Westergaard, J., Stoltze, K., Skjold, H., Danneskiold-Samsøe, B., Locht, H., Bendtzen, K. & Holmstrup, P. (2006) Periodontal and hematological characteristics associated with aggressive periodontitis, juvenile idiopathic arthritis, and rheumatoid arthritis. *Journal of Periodontology* **77**, 280–288.
- Hendler, A., Mulli, T. K., Hughes, F. J., Perrett, D., Bombardieri, M., Houry-Haddad, Y., Weiss, E. I. & Nissim, A. (2010) Involvement of autoimmunity in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research* **89**, 1389–1394.
- Kasser, U. R., Gleissner, C., Dehne, F., Michel, A., Willershausen-Zonnenchen, B. & Bolten, W. W. (1997) Risk for periodontal disease in patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **40**, 2248–2251.
- Kaur, S., White, S. & Bartold, P. M. (2013) Periodontal disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. *Journal of Dental Research* **92**, 399–408.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Maki-hira, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., Gonçalves, R. B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y. P., Miranda, L. A., Ernst, C. W., Izumi, Y. & Taubman, M. A. (2006) B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *American Journal of Pathology* **169**, 987–998.
- Malberg, K., Molle, A., Streuer, D. & Gangler, P. (1992) Determination of lymphocyte populations and subpopulations extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. *Journal of Clinical Periodontology* **19**, 155–158.
- Marotte, H., Farge, P., Gaudin, P., Alexandre, C., Mouglin, B. & Miossec, P. (2006) The association between periodontal disease and joint destruction in rheumatoid arthritis extends the link between the HLA-DR shared epitope and severity of bone destruction. *Annals of the Rheumatic Diseases* **65**, 905–909.
- Martinez-Martinez, R. E., Abud-Mendoza, C., Patino-Marin, N., Rizo-Rodriguez, J. C., Little, J. W. & Loyola-Rodriguez, J. P. (2009) Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 1004–1010.
- Mayer, Y., Balbir-Gurman, A. & Machtei, E. E. (2009) Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy and periodontal parameters in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Periodontology* **80**, 1414–1420.



- Mercado, F. B., Marshall, R. L., Klestov, A. C. & Bartold, P. M. (2001) Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Journal of Periodontology* **72**, 779–787.
- Nakajima, T., Amanuma, R., Ueki-Maruyama, K., Oda, T., Honda, T., Ito, H. & Yamazaki, K. (2008) CXCL13 expression and follicular dendritic cells in relation to B-cell infiltration in periodontal disease tissues. *Journal of Periodontal Research* **43**, 635–641.
- Oliver-Bell, J., Butcher, J. P., Malcolm, J., MacLeod, M. K., Adrados Planell, A., Campbell, L., Nibbs, R. J., Garside, P., McInnes, I. B. & Culshaw, S. (2015) Periodontitis in the absence of B cells and specific anti-bacterial antibody. *Molecular Oral Microbiology* **30**, 160–169.
- de Pablo, P., Dietrich, T. & McAlindon, T. E. (2008) Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *Journal of Rheumatology* **35**, 70–76.
- Pers, J. O., d'Arbonneau, F., Devauchelle-Pensec, V., Saraux, A., Pennec, Y. L. & Youinou, P. (2005) Is periodontal disease mediated by salivary BAFF in Sjogren's syndrome? *Arthritis and Rheumatism* **52**, 2411–2414.
- Pers, J. O., Saraux, A., Pierre, R. & Youinou, P. (2008) Anti-TNF-alpha immunotherapy is associated with increased gingival inflammation without clinical attachment loss in subjects with rheumatoid arthritis. *Journal of Periodontology* **79**, 1645–1651.
- Rosenstein, E. D., Greenwald, R. A., Kushner, L. J. & Weissmann, G. (2004) Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* **28**, 311–318.
- Seymour, G. J., Powell, R. N. & Davies, W. I. (1979) Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: an hypothesis. *Journal of Clinical Periodontology* **6**, 267–277.
- Slots, J., Kamma, J. J. & Sugar, C. (2003) The herpesvirus-Porphyrromonas gingivalis-periodontitis axis. *Journal of Periodontal Research* **38**, 318–323.
- Stein, J., Reichert, S., Gautsch, A. & Machulla, H. K. (2003) Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis? *Journal of Periodontal Research* **38**, 508–517.
- van Winkelhoff, A. J., Bosch-Tijhof, C. J., Winkel, E. G. & van der Reijden, W. A. (2001) Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *Journal of Periodontology* **72**, 666–671.

Address:  
Jacques-Olivier Pers  
Laboratory of Immunology  
Brest University Medical School Hospital  
BP824, F29609 Brest  
France  
E-mail: pers@univ-brest.fr

#### **Clinical Relevance**

*Scientific rationale for the study:* Periodontitis and rheumatoid arthritis (RA) present many similar features. Many observations suggest that the impact of anti-B cell therapy on periodontal

disease may be worthy of investigation. We thus examined the possibility that treatment of rheumatoid arthritis with rituximab may offer an opportunity to determine its effects on periodontitis.

*Principal findings:* Anti-B lymphocyte therapy could be beneficial to treat periodontitis in patients with rheumatoid arthritis.

*Practical implications:* B cells are clearly involved in the pathogenesis of periodontal diseases.

### Résumé article 3

Cet article porte sur les effets du RTX sur les parodontites. Cette étude a été réalisée dans le service d'odontologie de Brest et porte sur 21 patients qui ont été vus avant la première injection de RTX et revus ensuite 6 mois après traitement, sans traitement parodontal. Deux groupes ont été définis en fonction du protocole d'injection du RTX :

- Groupe I, constitué de 11 patients, qui n'avaient pas eu d'injection de RTX quand le bilan parodontal a été effectué. Ils étaient tous sous Méthotrexate (MTX). Cinq sujets du groupe I ont été suivis sur 48 mois et reçurent au moins 2 cures supplémentaires de RTX, et leur état parodontal a été réévalué.
- Groupe II, constitué de 10 patients qui avaient déjà reçu plus de 2 cures de RTX, avant l'évaluation de leur état parodontal. 8 sujets de ce groupe ont également reçu du MTX durant l'étude.

Au premier temps de l'examen parodontal, aucune différence n'est relevée entre les deux groupes au niveau de l'activité de la polyarthrite rhumatoïde (DAS28). À l'issue du traitement, une amélioration significative de la situation clinique parodontale a été constatée dans le groupe I après 6 mois de traitement : les profondeurs de poche et la perte d'attache étaient significativement diminuées. Les 5 sujets qui ont eu de nouvelles cures de RTX par la suite ont vu leur état parodontal continuer de s'améliorer. Les patients du groupe II avaient un statut parodontal meilleur que les patients du groupe I avant traitement par RTX.

Ainsi, cette étude a permis de constater que l'instauration d'une immunothérapie anti-CD20 est à l'origine d'une déplétion en LB et peut amener sans traitement parodontal à une amélioration des paramètres cliniques parodontaux.

## Discussion

Les résultats de ces deux études montrent que l'utilisation d'un anti-CD20 ou d'un anti-IL-6R pour traiter une PR peut être à l'origine d'une modification de la réponse inflammatoire, voire même d'une amélioration de l'état parodontal, sans traitement.

### 1- L'utilisation d'un Ac anti-IL-6R chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde modifie le profil cytokinique dans le fluide gingival

Le TCZ est un anticorps thérapeutique utilisé notamment dans le traitement des PR pour son action immunosuppressive. Il bloque l'IL-6R sous sa forme soluble (IL-6Rs) ou membranaire (IL6-Rm) [507]. Cela peut notamment avoir des répercussions sur les phénotypes des LB, notamment les LB mémoires DN, et les plasmocytes [508].

L'étude des effets du TCZ sur les parodontites comporte un faible nombre d'inclusions, lié à un changement de protocole d'utilisation du TCZ (en dehors du domaine hospitalier), qui a conduit à un arrêt prématuré de cette étude.

Nos résultats montrent une diminution du TNF- $\alpha$  dans le GCF sous l'action du TCZ dans les sites du groupe 2, correspondant à la présence d'une poche profonde et d'une perte d'attache. La diminution de ce facteur inflammatoire est à l'origine d'une légère amélioration des paramètres parodontaux, à l'échelle du site qui ne se retrouve pas dans notre étude à l'échelle du patient. En l'absence de traitement parodontal, il n'est pas possible, à ce jour, d'obtenir une amélioration du statut parodontal : une parodontite sévère ne peut pas devenir modérée, voire légère. Kobayashi et al. en 2014 [509] puis en 2015 [510] avaient cependant mis en évidence une amélioration des paramètres cliniques parodontaux et une inhibition du TNF- $\alpha$ , avec le TCZ. Dans l'étude de 2014 [509], ils se sont intéressés à l'action du TCZ sur les paramètres parodontaux. Ils comparèrent deux groupes de patients avec une PR et une parodontite chronique, avec (n=28) ou sans traitement par TCZ (n=28), à la fin du traitement et 8 semaines après. Immédiatement après le traitement, ils n'observèrent aucune différence entre les deux groupes, excepté au niveau du taux d'IL-6. Par contre, 8 semaines après traitement, ils notèrent une diminution des niveaux d'IL-6 et de MMP3, et une amélioration des paramètres parodontaux (Bleeding On Probing (BOP), PD, CAL). Ainsi, cette première étude montre qu'un délai est nécessaire après traitement pour observer des modifications cliniques. Le temps de traitement TCZ dans cette étude est en moyenne de 20 mois, contre 6 mois dans notre étude. L'absence d'amélioration clinique individuelle dans notre étude sur le

TCZ était un résultat attendu et peut s'expliquer par cette latence des effets cliniques suite à la diminution du TNF- $\alpha$  ; l'intensité de cette diminution est trop faible pour être visible cliniquement ou bien, il est possible que d'autres cytokines pro-inflammatoires compensent l'action de l'IL-6, et de ce fait, le niveau d'inflammation clinique paraît inchangé.

Dans l'étude de 2015 [510], Kobayashi et al. comparèrent les effets d'un traitement par TCZ et par un anti-TNF- $\alpha$  sur le parodonte. Le nombre de patients présentant à la fois une PR et une parodontite était plus important (n= 60), réparti entre ces deux groupes. Les paramètres parodontaux ont été relevés en début de traitement, à 3 et 6 mois après le traitement. Les deux thérapeutiques aboutirent à une amélioration de l'état parodontal et de l'inflammation avec une réduction significative du CAL après traitement par TCZ, mais pas par l'anti-TNF- $\alpha$ . Comme nous, dans le CGF, ils mirent en évidence une diminution des niveaux sériques de TNF- $\alpha$ .

L'induction de l'IL-6 est sous la dépendance du TNF- $\alpha$  [511], mais l'inverse est également décrit [512]. La dualité et la complexité de l'action de l'IL-6 ne permettent pas de conclure si son inhibition conduirait à un effet pro- ou anti-inflammatoire [507, 513]. En effet, deux voies d'action sont décrites au niveau de l'IL-6 : la voie classique qui passe par l'activation de l'IL6-Rm et la voie trans (trans-signalisation) qui passe par l'interaction de l'IL-6 avec son récepteur soluble [507]. Ces deux récepteurs vont tous deux interagir avec le gp130, une protéine trans-membranaire relativement ubiquitaire [507], et être à l'origine d'effets opposés. La voie classique a un rôle dans les processus anti-inflammatoire et de réparation tissulaire, proches de ceux décrits pour l'IL-10 et la voie trans induit une réponse proinflammatoire [512, 514]. Par ailleurs, l'expression de l'IL-6Rm est caractéristique de certains types cellulaires spécifiques (hépatocytes, monocytes et quelques lymphocytes), alors que la voie trans peut concerner de nombreux types cellulaires. L'IL-6Rs est notamment sécrétée par les LT activés et les monocytes [507]. De même, d'autres interleukines (IL-11), présentent des voies d'action intégrant une interaction avec le gp130 voire induisent (IL-1 $\beta$ ) son expression membranaire [512, 515].

Le taux d'IL-6 augmente dans les parodontites et il est produit par de nombreux types cellulaires, notamment les LB et les plasmocytes [516, 517] et il peut moduler l'expression de CD5 sur les LB [518]. Le taux d'IL6-Rs est probablement très élevé dans les sites profonds également et impliqué dans l'expression de TNF- $\alpha$ . L'inhibition de cette voie par le TCZ aboutit ainsi à une diminution plus importante de la voie pro-inflammatoire que de la voie



anti-inflammatoire, et se traduit par une diminution significative du TNF- $\alpha$ . Cela est cohérent avec ce qui est observé dans le traitement des PR : les meilleures réponses au traitement par TCZ sont décrites dans les situations où le taux d'IL-6 est élevé et le taux d'IL-6Rs est faible [519].

Son utilisation dans le traitement des parodontites pourrait présenter un intérêt aussi bien localement qu'au niveau général. Cependant, son utilisation doit être réalisée avec prudence, car les traitements par TCZ peuvent être source d'infections (voir article 1). Elle a l'avantage de cibler l'ensemble de la réponse immunitaire et de l'orienter vers une diminution de la réponse inflammatoire, sans préférence pour un type cellulaire particulier comme, nous le verrons, avec le RTX.

Il semblerait d'ailleurs qu'en cas d'échec du traitement par Ac anti-TNF- $\alpha$  dans les PR, le TCZ serait plus efficace que le RTX [520].

## **2- L'utilisation d'un anti-CD20 chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde améliore l'état parodontal des patients**

Notre étude a montré que l'utilisation d'un Ac anti-CD20 améliorait l'état parodontal des patients. L'utilisation du RTX a déplété en LB et permis une nette amélioration de l'état parodontal des patients, sans traitement parodontal, surtout lorsque les injections sont répétées. À l'instar de ce qui a été montré *in vitro* ou sur l'animal [35-37], cette étude a mis en avant le rôle central du LB dans la pathogénie parodontale. Le temps de traitement, la répétition des injections ou le ciblage du LB peuvent être des éléments qui expliquent des effets cliniques plus importants avec le RTX que le TCZ.

### **a- Le CD20, cible du Rituximab**

L'antigène de surface CD20 est une phosphoprotéine glycosylée qui est exprimée à tous les stades de différenciation des LB, à l'exception des pré-proB, des plasmablastes et des plasmocytes. Le CD20 est spécifique de la lignée lymphocytaire B ; il participe à la régulation des transports transmembranaires de calcium et intervient dans la progression du cycle cellulaire après activation des LB. La fonction du CD20 reste cependant méconnue [521]. Il est hautement exprimé à la surface des LB. Lors de leur maturation en plasmocytes, il n'est pas éliminé de la surface de la cellule, mais il est internalisé [522].

Le CD20 est la cible d'anticorps monoclonaux, et nous avons étudié les effets du RTX (Rituxan® ou MabThera®) sur les maladies parodontales. Le RTX se fixe sur le CD20, et

modifie l'influx calcique des cellules. Cette fixation entraîne la mort cellulaire par différents mécanismes, parfois associés, passant par une activation du complément et l'induction directe de l'apoptose. Après avoir fixé l'Ag, l'Ac anti-CD20 active la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), transmise par les FcyR (Fcy Receptors) situés sur les PN, les Mo et les NK.

Une faible densité membranaire d'antigène CD20, une sélection de molécules CD20 mutantes ou une localisation des cellules cibles dans des niches protectrices (LB1 péritonéaux) permettent à certains LB d'échapper à la toxicité des Ac anti-CD20 [521]. Ainsi les traitements par Ac anti-CD20 semblent être à la l'origine d'une déplétion plus importante des LB2 que des LB1 [523].

### **b- Les Ac anti-CD20 améliorent l'état parodontal**

L'immunothérapie anti-TNF- $\alpha$  dans les PR avait déjà montré en 2008 un impact positif sur l'état parodontal des patients [40]. Cette étude avait montré que malgré une inflammation gingivale plus marquée après traitement, il y avait une réduction de la perte d'attache et un effet protecteur sur la perte osseuse. Ainsi l'inflammation et les destructions constituent deux composants interreliés, mais séparés des parodontites des patients présentant une PR. La persistance de l'inflammation gingivale est probablement due à une compensation par d'autres voies de signalisation (IL-6, IL-17, IL-23). Le blocage du TNF- $\alpha$  pourrait être ainsi bénéfique pour le traitement des parodontites, en raison de ses capacités d'inhiber la perte osseuse.

Cependant, dans notre étude, l'action du RTX, semble être responsable d'une meilleure protection du parodonte comparée à une immunothérapie anti-TNF- $\alpha$ . Le LB a un rôle central dans tous les processus inflammatoires et son action ne peut pas être facilement compensée par d'autres cytokines, comme pour le TNF- $\alpha$ . L'augmentation de BAFF et APRIL et la corrélation entre APRIL et BAFF avec RANKL, dans le GCF des parodontites [384, 455, 524], avaient déjà mis en évidence le rôle central du LB dans les maladies parodontales chez l'Homme, au même titre que les travaux réalisés chez les souris déficientes en LB [35-37].

Le RTX n'a que peu d'action sur le métabolisme osseux [525], mais une amélioration des lésions osseuses articulaires est observée chez les patients sous RTX [526]. Les effets directs du RTX sur le remodelage osseux sont méconnus : l'utilisation de RTX ne change pas le taux de RANKL, mais une diminution significative de la dégradation osseuse est observée

15 mois après traitement par RTX. Il n'y a pas d'influence systémique négative sur le remodelage osseux lié à l'utilisation du RTX, même si une diminution de l'activité ostéoclastique est constatée [525]. Le rôle du RTX sur la perte osseuse est donc indirect en diminuant la promotion de l'inflammation par les LB activés. Ainsi, comme dans ces études, une déplétion en LB semble réguler l'inflammation gingivale et la résorption tissulaire

Bien que les effets du RTX sur les parodontites, montrés dans notre étude, soient encourageants et que l'utilisation du RTX pourrait aider le traitement des maladies parodontales, son administration doit être prudente. Il existe un risque important d'infection sévère suite à l'injection de cet anti-CD20 [527] ou d'une extension de l'infection plus importante, et d'une clairance bactérienne altérée au niveau parodontal.

À partir de ces différentes constatations, nous avons mis en place l'étude LBParo et la biocollection OdontoBrest qui seront présentées dans la section suivante, afin d'étudier le rôle des LB dans les maladies parodontales.

**Article 4 : B cell subset distribution is altered in patients with severe periodontitis.  
(publié)**

Le LB a été peu étudié dans la parodontite et le phénotype des LB dans le sang et la gencive n'avait pas encore été pleinement exploré au moment de la mise en place de l'étude. Il nous semblait alors nécessaire de caractériser les sous-populations de LB présentes au cours de l'installation et de l'évolution de la maladie parodontale. Nous cherchions à déterminer si une maladie parodontale pouvait avoir une influence sur la distribution phénotypique des LB circulants ("transitionnel", "immature", LB "mature" ou "mémoire") et à caractériser celui des LB dans des biopsies gingivales. L'analyse des LB dans le sang pouvait permettre de mettre en évidence l'association d'une sous-population particulière avec l'agressivité de la maladie parodontale, ou la sévérité. Cela permettrait de mieux comprendre la physiopathologie des maladies parodontales, d'affiner le diagnostic et de mieux poser un pronostic vis-à-vis de l'évolution d'une atteinte parodontale, ou encore servir à suivre la réponse au traitement et à anticiper la récurrence.

Nous avons pour cela mis en place le protocole d'étude LB Paro et une biocollection d'échantillons biologiques humains, la collection OdontoBrest.

**1- Création de la biocollection OdontoBrest**

L'objectif d'une biocollection est de créer une bibliothèque d'échantillons de tissus biologiques utilisables dans différentes études en cours et à venir. La biocollection OdontoBrest (OdontoBrest biocollection: DC 2014-2158) a été mise sur pied pour réaliser l'étude LBParo dans un cadre légal et éthique ; elle constitue une biocollection d'échantillons de tissus et fluides buccaux (dents, gencives, salive, fluide gingival, bactéries) et de sang. Les échantillons sont sous la responsabilité du CRB (Centre de Ressources Biologiques) du CHU de Brest et sont stockés au laboratoire d'immunologie de Brest (Unité Inserm 1227, LB et Autoimmunité). Les objectifs de cette biocollection sont accessibles dans les annexes (Annexe 3).

Son objectif est de permettre une meilleure compréhension des pathologies buccales et leurs interactions au niveau systémique.

## **2- Mise en place de l'étude LB PARO - PARODONTITE ET INFLAMMATION : APPROCHE CLINIQUE ET BIOLOGIQUE DU RÔLE DU LYMPHOCYTE B.**

Le protocole de l'étude LB Paro a été déposé en 2015 et enregistré dans [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) sous la référence NCT02833285. L'ensemble du protocole est accessible en annexe de ce travail, ainsi que les documents de travail s'y rapportant (Annexe 2). Ainsi 4 panels pour une étude en cytométrie en flux ont été définis :

- 3 panels d'étude sur le sang total de patient : Panel B, Panel B1, Panel T. 31 patients ont été étudiés au niveau du sang.
- 1 panel d'étude sur éluât de gencive, après préparation par broyage : Panel Gencive. 5 patients ont été analysés, et 4 échantillons ont été exploitables.

Pour l'article, nous avons choisi de ne présenter que les données des patients diagnostiqués « Parodontite Sévère » (SP) suivant la classification de Page & Ecke 2012 [48, 49] afin de valider notre hypothèse sur la nature systémique de la maladie parodontale sévère.

## **3- Présentation de l'article**

L'objectif de cet article est de présenter les caractéristiques phénotypiques des LB au niveau du sang dans les parodontites sévères. Nous avons choisi de travailler sur les SP, car l'inflammation y est probablement plus marquée et notre hypothèse était qu'une maladie parodontale sévère pouvait avoir des manifestations systémiques visibles sur la distribution phénotypique des LB circulants. Nous présentons ainsi les résultats des panels B et B1 utilisés chez ces patients, en comparaison avec un groupe témoin, sans atteinte parodontale. Le panel T a été réalisé, mais ne montre pas de résultats significatifs, comme nous le discuterons après cet article.

## RESEARCH ARTICLE

# B cell subset distribution is altered in patients with severe periodontitis

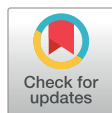
Julien Demoersman<sup>1,2</sup>, Pierre Pochard<sup>1,2</sup>, Camille Framery<sup>3</sup>, Quentin Simon<sup>1,2</sup>, Sylvie Boisramé<sup>3</sup>, Assem Soueidan<sup>4,5</sup>, Jacques-Olivier Pers<sup>1,2,3\*</sup>

**1** UMR1227, Université de Brest, Inserm, Brest, France, **2** LabEx IGO, Brest, France, **3** Service d'odontologie, CHU Brest, Brest, France, **4** Department of Periodontology, CHU de Nantes, Nantes, France, **5** Rmes Inserm U1229/UIC11, Université de Nantes, Nantes, France

\* pers@univ-brest.fr

## Abstract

Several studies have recently highlighted the implication of B cells in physiopathogenesis of periodontal disease by showing that a B cell deficiency leads to improved periodontal parameters. However, the detailed profiles of circulating B cell subsets have not yet been investigated in patients with severe periodontitis (SP). We hypothesised that an abnormal distribution of B cell subsets could be detected in the blood of patients with severe periodontal lesions, as already reported for patients with chronic inflammatory diseases as systemic autoimmune diseases. Fifteen subjects with SP and 13 subjects without periodontitis, according to the definition proposed by the CDC periodontal disease surveillance work group, were enrolled in this pilot observational study. Two flow cytometry panels were designed to analyse the circulating B and B1 cell subset distribution in association with the RANKL expression. A significantly higher percentage of CD27<sup>+</sup> memory B cells was observed in patients with SP. Among these CD27<sup>+</sup> B cells, the proportion of the switched memory subset was significantly higher. At the same time, human B1 cells, which were previously associated with a regulatory function (CD20<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), decreased in SP patients. The RANKL expression increased in every B cell subset from the SP patients and was significantly greater in activated B cells than in the subjects without periodontitis. These preliminary results demonstrate the altered distribution of B cells in the context of severe periodontitis. Further investigations with a larger cohort of patients can elucidate if the analysis of the B cell compartment distribution can reflect the periodontal disease activity and be a reliable marker for its prognosis (clinical trial registration number: NCT02833285, B cell functions in periodontitis).



## OPEN ACCESS

**Citation:** Demoersman J, Pochard P, Framery C, Simon Q, Boisramé S, Soueidan A, et al. (2018) B cell subset distribution is altered in patients with severe periodontitis. PLoS ONE 13(2): e0192986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192986>

**Editor:** Yolande Richard, Institut Cochin, FRANCE

**Received:** December 20, 2017

**Accepted:** February 1, 2018

**Published:** February 15, 2018

**Copyright:** © 2018 Demoersman et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

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

## Introduction

Periodontitis is a bacterial biofilm-induced chronic inflammatory disease leading to the destruction of tooth-supportive structures (gingiva, alveolar bone and periodontal ligament). Dysbiotic microbiota and a susceptible host are required to develop periodontitis [1], which is associated with an increased risk for certain systemic disorders such as rheumatoid arthritis,

diabetes mellitus or atherosclerosis [2]. Inflammatory processes are mediated by various inflammatory and stromal cell types that lead to tissue destruction. These bacteria-induced inflammatory mechanisms are the suspected links between periodontitis and inflammatory systemic syndromes [3,4]. Despite a better management of periodontitis, the prevalence of severe periodontitis (SP) remained stable for thirty years [5]. Diagnosis and monitoring of SP rely on traditional clinical examinations which are inadequate to predict patient susceptibility, disease activity, and response to treatment [6]. The requirement for reliable biomarkers to distinguish progressive periodontitis from normal biological processes is considered fundamental to conduct the appropriate treatment.

Despite their high predominance in advanced periodontal lesions [7,8], B cell and plasma cell functions in periodontitis remain incompletely characterised. B cells seem to have a dual role in periodontitis, both protective by facilitating bacterial clearance and destructive by promoting inflammation, bone resorption and matrix dissolution [9,10]. In this context, B cells produce not only a variety of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and tumor growth factor (TGF)- $\beta$ , but also pro-inflammatory factors, such as tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6 or matrix metalloproteinases, which contribute to the degradation of connective tissue. Regulatory B cells, which are deficient in some autoimmune diseases, can also have a role in periodontitis [11]. Regulatory B cells are indeed a source of anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-10 and TGF- $\beta$ ), express high levels of CD25 and CD86, and are able to suppress Th1 proliferation and contribute to the maintenance of self-tolerance [11].

Bone resorption is mediated by the triad receptor activator of nuclear factor B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG)/RANK. RANKL is a ligand for RANK, a receptor expressed by osteoclast precursors, and a RANK-RANKL interaction promotes osteoclastogenesis [12]. Interestingly, B cells have been reported to be a major source of RANKL in periodontitis [13].

As the important role of B cells in pathogenesis of periodontal disease has been recently highlighted by studies showing that a B cell deficiency leads to improved periodontal parameters [14–17], we hypothesised that an abnormal distribution of B cell subsets could be detected in the blood of patients with severe periodontal lesions, as already reported for patients with chronic inflammatory diseases as systemic autoimmune diseases. We also assessed the RANKL expression in the B cell subsets in connection with the severity of periodontitis. This pilot study showed an increase in memory and activated B cells expressing RANKL and a depletion of circulating CD11b<sup>+</sup> B1 cells with a regulatory phenotype in SP patients.

## Materials and methods

### Subject recruitment

This publication is conformed to the STROBE guidelines (Fig 1 and S1 Table). This study was conducted in a dental clinic at Brest Hospital in France. The protocol was registered on clinicaltrials.gov (NCT02833285) (S1 and S2 Figs) and approved by the ethical committee of the Brest hospital (April 9th, 2015) (S3 Fig). Between May 2015 and December 2016, 28 subjects were recruited and included in two different groups, namely, 15 subjects with SP and 13 subjects without periodontitis [non-periodontitis (NoP) control group], according to the definition proposed by the CDC periodontal disease surveillance work group and supported by the American Academy of Periodontology to define periodontitis severity [18]. SP was defined as the presence of two or more interproximal sites with  $\geq 6$  mm clinical attachment loss (CAL, not on the same tooth) and one or more interproximal site(s) with  $\geq 5$  mm pocket depth (PD). According to the same classification, patients with moderate periodontitis (those who did not meet the SP case definition, and defined as 2 or more interproximal sites with  $\geq 4$  mm

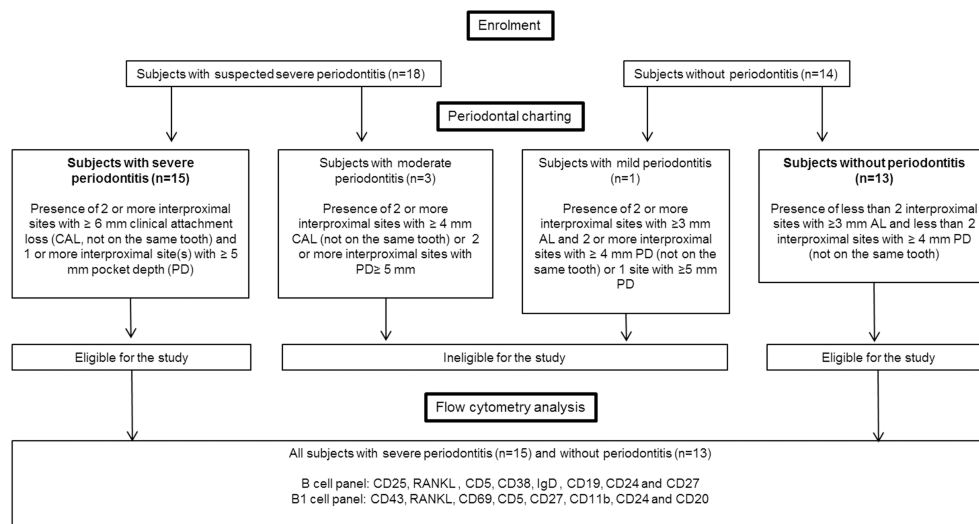


Fig 1. STROBE checklist.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192986.g001>

CAL (not on the same tooth) or 2 or more interproximal sites with  $PD \geq 5$  mm, also not on the same tooth) or mild periodontitis (those who met neither the severe nor moderate periodontitis case definition, defined as  $\geq 2$  interproximal sites with  $\geq 3$  mm AL and  $\geq 2$  interproximal sites with  $\geq 4$  mm PD (not on the same tooth) or 1 site with  $\geq 5$  mm PD) were excluded from this study. Consequently, the second group is only composed of patients without periodontitis.

The exclusion criteria were: minor, patient having taken antibiotics in the previous 3 months, patients with systemic diseases including chronic inflammatory disease, pregnancy, orthodontic treatment ongoing. Furthermore all the enrolled patients and controls had no treatment with corticosteroids, immunosuppressants or biological agents. A consent chart to participate in the study was signed, and the samples were managed and recorded in a biologic collection of human samples at Brest Hospital (OdontoBrest biocollection: DC 2014–2158).

### Clinical measurements

The same examiner (CF) routinely performed all clinical examinations and periodontal charting. The whole-mouth clinical periodontal parameters, including O'Leary plaque index, bleeding on probing (BOP), CAL and PD, were determined at four interproximal sites per tooth. PD was defined as the distance in millimetre (mm) from the most coronal portion of the free gingival margin to the most apical penetration of the periodontal probe. CAL was defined as the distance in mm from the cemento–enamel junction to the most apical penetration of the probe. PD and CAL were measured with a constant pressure periodontal probe and recorded to the nearest mm; every observation close to 0.5 mm was rounded off to the lower whole number. Decayed, missing and filled teeth, oral hygiene habits, smoking status and removable or fixed prosthetic appliances were assessed.



All periodontal chart measurements were noted in a programmed Excel table (Microsoft, 2011). Clinical indices, periodontal scores and diagnosis according to the Page and Eke classification [18] were automatically calculated for each subject.

### Flow cytometry analysis of circulating B cells

Peripheral blood was collected for biological and cytometry analyses. Blood was analysed in two panels dedicated to B cells. For the first panel, 200 µl of blood was previously washed twice with phosphate-buffered saline to remove free IgM. This nine-colour panel includes FITC-conjugated anti-CD25, PE-conjugated anti-RANKL (Biolegend), ECD-conjugated anti-CD5, PC5.5-conjugated anti-CD38, PC7-conjugated anti-CD27, APC-conjugated anti-IgD (Becton Dickinson), AAF700-conjugated anti-CD19, AAF750-conjugated anti-CD24 and Pacific Blue-conjugated anti-IgM antibodies (Abs). This panel distinguished CD25<sup>+</sup> activated CD19<sup>+</sup> B cells, CD19<sup>lo</sup>CD38<sup>hi</sup>CD27<sup>hi</sup> plasmablasts, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup> transitional B cells, CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> B cells, switched memory CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B cells, unswitched memory CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B cells, double negative CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> B cells, CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>CD24<sup>lo</sup> mature B cells and CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup> naïve B cells. The second eight-colour panel was designed for a fine analysis of CD5<sup>+</sup> B cells and human B1 cells as described by Griffin et al [19]. This panel included FITC-conjugated anti-CD43, PE-conjugated anti-RANKL, ECD-conjugated anti-CD69, PC5.5-conjugated anti-CD5, PC7-conjugated anti-CD27, APC-conjugated anti-CD11b, AAF750-conjugated anti-CD24 and Pacific Blue-conjugated anti-CD20 Abs. This panel distinguished CD20<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>, CD20<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup> B cells and B1 cells defined as CD20<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>. All Abs unless specified were from Beckman Coulter. Red blood cells were lysed using Versalys<sup>®</sup> solution (Beckman Coulter, Fullerton, CA) before analysis on the Navios flow cytometer (Beckman Coulter).

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed by GraphPad (Prism IBM SPSS, GraphPad 5). Non-parametric variables were analysed by the Mann–Whitney or Fisher test and correlated by the Pearson r test. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

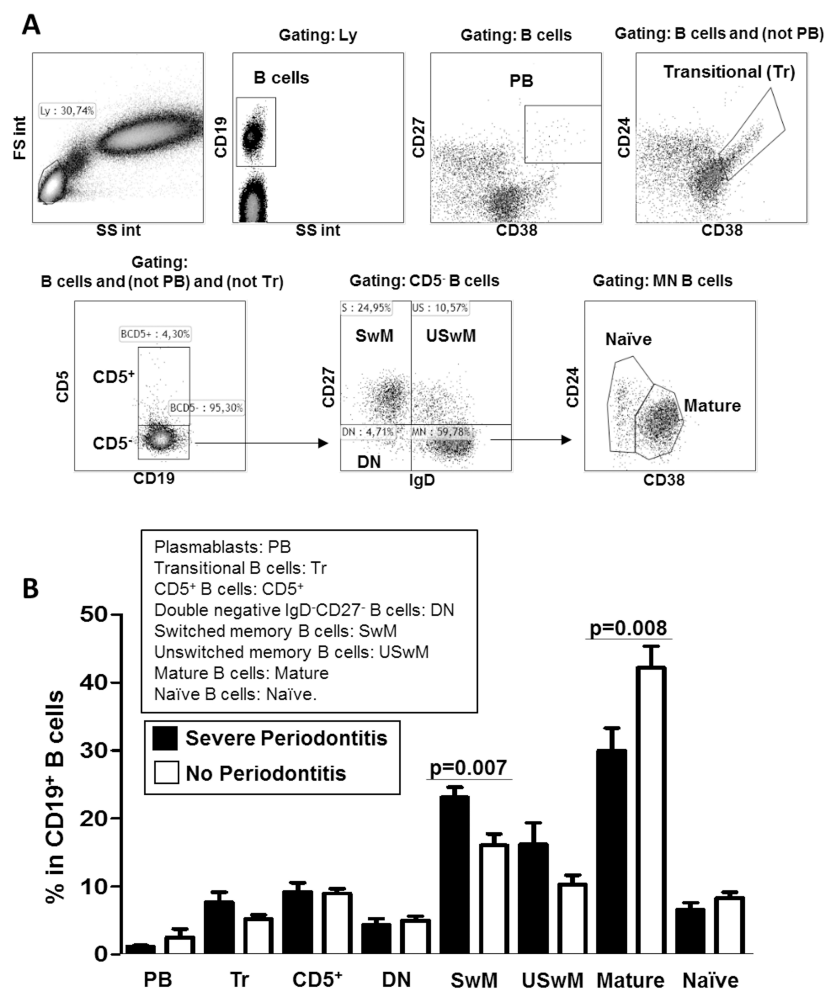
## Results

### Distribution of total leukocytes is normal in severe periodontitis

Among the 15 patients included in the SP group, six were women (39%) compared with seven (54%) in the NoP control group ( $p = 0.7$ ). The mean age was  $42.1 \pm 10.0$  for SP patients and  $30.8 \pm 9.7$  for the NoP controls ( $p = 0.0023$ ). Smoking habits were 32% for SP patients and 38% for NoP controls ( $p = 1$ ). In whole blood, patients with SP have the same absolute number of leukocytes with the NoP controls ( $6658 \pm 2159$  vs.  $5614 \pm 1185$ , respectively,  $p = 0.3$ ). No difference was observed in the distribution and absolute number of total B cells between the SP and NoP groups ( $9.0 \pm 3.5\%$  vs.  $8.3 \pm 2.9\%$ ,  $p = 0.40$  and  $310 \pm 234$  vs.  $105 \pm 110$ ,  $p = 0.11$  respectively).

### Memory B cells are predominant in patients with severe periodontitis

A fine analysis of the B cell subset distribution was conducted according to the gating strategy described in Fig 2A. Changes in the B cell subset distribution were then observed in the SP patients with a notably higher percentage and absolute number of CD27<sup>+</sup> memory B cells ( $42.7 \pm 11.6\%$  for SP patients vs.  $29.4 \pm 11.3\%$  for NoP controls,  $p = 0.01$ , and  $151 \pm 137$  for SP patients vs.  $42 \pm 12$  for NoP controls,  $p = 0.046$ ). Among these CD27<sup>+</sup> B cells (Fig 2B), the



**Fig 2. Phenotype of B subsets in whole blood of patients with severe periodontitis (SP) and controls (No Periodontitis).** A) The gating strategy used after doublet exclusion allows the characterisation eight different and distinct B cell subsets. B) Circulating B cell distribution reveals an increase in the switched memory B cells and a decrease in the mature B cells in the SP patients in comparison with the controls. p value is indicated when significant. Plasmablasts: PB; Transitional B cells: TR; CD5<sup>+</sup> B cells: CD5<sup>+</sup>; double negative IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> B cells: DN; switched memory B cells: SwM; unswitched memory B cells: USwM; mature B cells: Mature and naïve B cells: Naïve.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192986.g002>

proportion in B cells and the absolute number of the switched memory subset (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>) were significantly higher in the SP patients in comparison with the NoP controls (23.1±8.0% vs. 16.0±6.0%, p = 0.007, and 66±52 vs. 25±10, p = 0.024, respectively). Interestingly, the percentage of mature B cells decreased among the SP patients (30.0±12.7% for SP

patients vs.  $42.1 \pm 11.5\%$  for the NoP controls,  $p = 0.008$ ), thus suggesting a B cell differentiation in the memory phenotype among the SP patients (Fig 2B).

### B1 cells and $CD5^+$ B cells are reduced in severe periodontitis patients

Although the  $CD5^+$  B cell distribution appeared similar the SP group and the controls ( $9.2 \pm 5.3\%$  for SP patients vs.  $9.0 \pm 2.6\%$  for NoP controls, Fig 2B), we analysed this subset previously reported to be higher in gingival tissue of periodontitis patients [7, 20]. The gating strategy is described in Fig 3A. The proportion of  $CD20^+CD11b^+CD5^+$  B cells, previously associated with a regulatory phenotype, was lower in SP patients than in the NoP controls ( $5.0 \pm 2.3\%$  vs  $6.5 \pm 2.1\%$ ,  $p = 0.044$ , respectively, Fig 3B). Interestingly, a decrease in the B1  $CD20^+CD69^+CD43^+CD27^+$  subset was observed in the SP patients in comparison with the controls ( $2.5 \pm 1.5\%$  vs.  $4.9 \pm 1.9\%$ ,  $p = 0.005$ , respectively, Fig 3C). Phenotypic and functional subdivisions of human B1 cells have been described: the  $CD11b^-$  B1 cells primarily secrete antibody, and the  $CD11b^+$  B1 cells spontaneously produce IL-10 and suppress T-cell activation [21]. We reported an important decrease in  $CD11b^+$  B1 cells in the SP patients in comparison with the controls ( $2.0 \pm 1.1\%$  for SP patients vs.  $4.2 \pm 1.6\%$  for the NoP controls,  $p = 0.002$ ). The  $CD11b^-$  B1 subset was not different between the two groups ( $0.5 \pm 0.4\%$  for SP patients vs.  $0.7 \pm 0.5\%$  for the NoP controls). Altogether, these results suggest a depletion of circulating B cells with a regulatory phenotype in SP patients in comparison with the NoP control group.

### RANKL expression in B cell subsets

The RANKL expression in B cell subsets was assessed in all B cell subsets (Fig 4). The RANKL mean fluorescence intensity (MFI), which corresponds to the level of RANKL expression in the membrane of B cells, appears to be important in some patients with SP while never increased in the NoP group. When increased, the RANKL MFI on B cells in SP patients (Fig 4) was not specific to a cell subset but appeared to be related to a general increase in expression in all subsets.

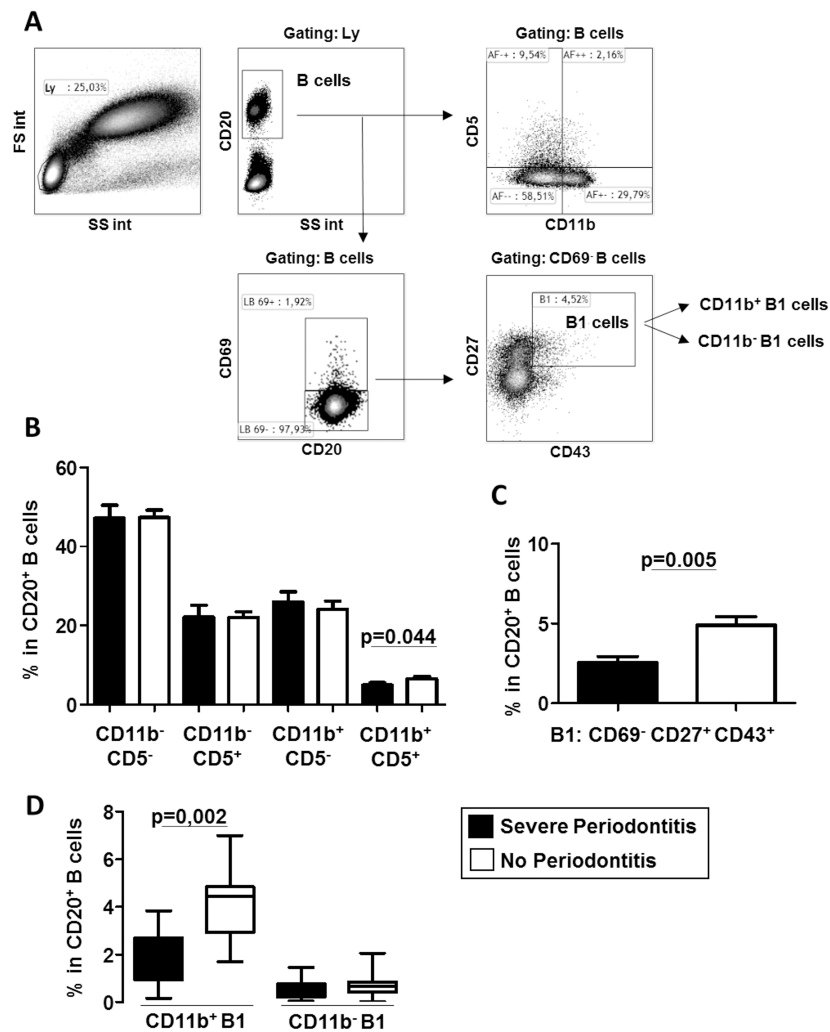
### B cells from severe periodontitis patients present an activated phenotype

CD69 and CD25 were described as B cell activation markers. The percentages and absolute numbers of  $CD69^+$  (Fig 5A) and  $CD25^+$  (Fig 5B) B cells were higher in the SP patients in comparison with the controls ( $3.1 \pm 2.0\%$  vs.  $1.8 \pm 0.7\%$ ,  $p = 0.036$ , and  $11 \pm 8$  vs.  $3 \pm 1$ ,  $p = 0.006$  for  $CD69^+$  B cells and  $23.6 \pm 11.9\%$  vs.  $15.6 \pm 6.9\%$ ,  $p = 0.004$ , and  $77 \pm 79$  vs.  $20 \pm 9$ ,  $p = 0.014$ , for  $CD25^+$  B cells, respectively). The RANKL MFI significantly increased in  $CD69^+$  activated B cells from SP patients in comparison with that from the NoP controls ( $3.3 \pm 1.7$  vs.  $1.6 \pm 0.5$ ,  $p = 0.006$ , respectively, Fig 5A).

### Discussion

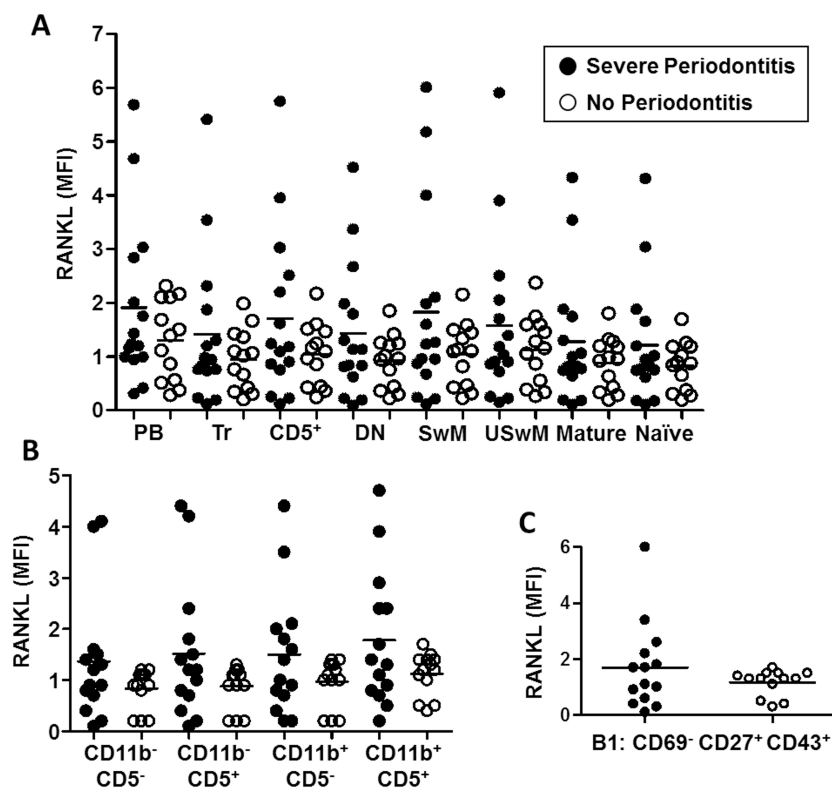
Our pilot study showed for the first time that SP patients presented an altered distribution of peripheral blood B cells with a higher proportion of memory B cells, especially switched memory B cells, and a lower proportion of regulatory  $CD11b^+$  B1 cells.

A limitation of this study could be the age difference between the SP and the non-periodontitis groups. Some studies [22,23] have described, in the elderly, a reduction of naïve B cells associated with the expansion of memory B cells. However, these memory B cells showed a senescence-associated phenotype with the accumulation of a  $CD27^-IgD^-$  double negative population. More interestingly, the switched memory B cells, significantly higher in SP patients in



**Fig 3. Phenotype of B1 and CD5<sup>+</sup> B cells in whole blood of patients with severe periodontitis (SP) and controls (No Periodontitis).** A) The gating strategy used after doublet exclusion allows the characterisation of B cells according to CD11b and CD5 expression but also the human B1 subset (CD20<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>). B) Circulating B cell distribution according to CD11b and CD5 expression reveals a decrease in the CD11b<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup> B cells in the SP patients in comparison with the controls. C) B1 cells are lower in the SP patients in comparison with the controls. D) Among B1 cells the CD11b<sup>+</sup> B1 regulatory subset is markedly decrease in the SP patients. p value is indicated when significant.

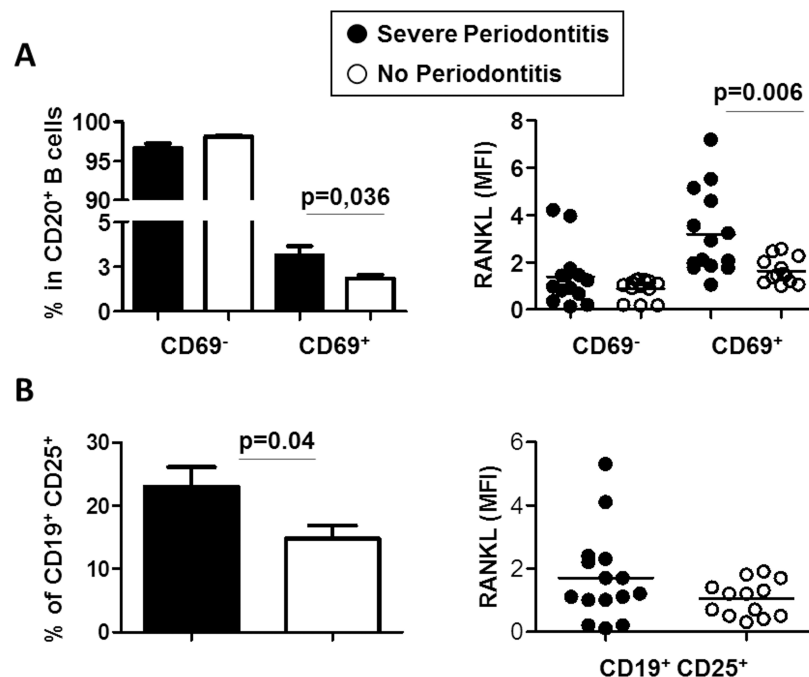
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192986.g003>



**Fig 4. Expression of RANKL in the B cell subsets from patients with severe periodontitis and controls (No Periodontitis).** A) Expression of RANKL in the eight distinct B cell subsets defined in Fig 1. B) Expression of RANKL in the circulating B cell distribution according to CD11b and CD5 expression. C) Expression of RANKL in B1 cells. Mean fluorescence intensity: MFI; Plasmablasts: PB; Transitional B cells: Tr; CD5<sup>+</sup> B cells: CD5<sup>+</sup>; double negative IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> B cells: DN; switched memory B cells: SwM; unswitched memory B cells: USwM; mature B cells: Mature and naïve B cells: Naïve.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192986.g004>

our study, were reported lower both in frequency and absolute number with age, suggesting an intrinsic defect in the ability of such B cells from elderly individuals to undergo class switch [24]. Furthermore, although the proportion of CD19<sup>+</sup> B cells decreases until age 35, B cells remains steady up to age 65 [25] and when young healthy donors (HD) (mean age = 28.5±1.9 years) and mild-aged HD (mean age = 69.1±3.9 years) are compared, similar percentages of CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> switched memory B cells were found [26]. The same observation was reported by Morbach et al [27], with reference values for memory B cells, in 26 to 50 years old HD, corresponding to 15.2% (13.4–21.4) for CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> unswitched memory and to 13.2% (9.2–18.9) for CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> switched memory B cells. These reference values are similar to those observed in our NoP control group. In healthy adults, B cells represent 9–10% of all lymphocytes [27]. The proportions of B cells, both in the periodontitis and non-periodontitis groups, are consistent with this description. Therefore, SP does not seem to affect the number of circulating B



**Fig 5. Expression of B cell activation markers in the B cell subsets from patients with severe periodontitis (SP) and controls (No Periodontitis).** A) The percentage of CD69<sup>+</sup> B cells expressing RANKL was higher in the SP patients in comparison with the controls. B) The percentage of CD25<sup>+</sup> B cells was higher in the SP patients in comparison with the controls. Mean fluorescence intensity: MFI, p value is indicated when significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192986.g005>

cells. When comparing healthy controls with patient with periodontal disease stages (gingivitis and moderate periodontitis), Mahanonda et al. observed no differences in the peripheral blood B cell subsets [28]. In this study, the different subsets of B cells were only identified employing a mixture of 3 mAbs (anti-CD19, anti-CD27 and anti-CD38 mAbs) when compared to the 9-colour panel used in our study. Consequently, memory B cells were characterized as CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> and they cannot distinguish switched memory B cells from unswitched memory B cells. However, they found that memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) represented the majority in the B cell population in clinically healthy gingiva and in gingivitis tissues (around 90% of the B cell population). The density of memory B cells was lower in periodontitis tissues (around 40% of the B cell population), and plasma cells were predominant. Interestingly, in our study, memory B cells were higher in the peripheral blood of SP patients, but mature B cells were lower in comparison with the NoP group. Furthermore, the distribution of naïve and transitional B cell subsets was equivalent in both groups. These observations suggest a B cell differentiation process that occurs in the secondary lymph nodes of SP patients. We can then hypothesise that memory B cells will reach gingival tissues, where a terminal differentiation into plasmablasts and plasma cells takes place.

A strong expression of CXCL13 in the endothelium was observed in periodontal tissues, suggesting that CXCL13 played a role in B cell entry to gingival tissues [29]. Furthermore, BAFF mRNA and protein were upregulated in gingival tissues from both patients with chronic periodontitis and those with experimental periodontitis, and the augmentations correlated with the increased numbers of B cells/plasma cells [30]. In this context, the BAFF-mediated increase in CXCL13-dependent chemotaxis was reported to be greater for the memory B cells than for the naive B cells [31] regulating the memory B cell recruitment in the gingival tissues of SP patients.

During their development and maturation through the germinal centre, memory B cells are somatically mutated in class-switched memory B cells, thus losing their IgD expression and replacing IgM by another immunoglobulin (IgA, IgG or IgE) [32]. Our results showed a predominance of switched memory B cells in SP, and the development of switched memory B cells was intimately connected with plasma cells development [32]. Our preliminary findings on cell distribution in gingival biopsies from SP patients by flow cytometry analyses after elution confirmed the importance of the plasmablast compartment [7,20].

Interestingly, periodontal therapy resulted in a reversal shift of the tissue B cell profile, which became comparable with the one observed in clinically healthy and gingivitis tissues, where the majority of B cells were memory and not plasma cells [28]. Consequently, evaluating whether the level of peripheral memory B cells returns to normal after periodontal treatment and could be used as a good prognostic marker for patients is important in future studies. This abnormal shift can then be used in the follow-up of patients.

However, some questions remain regarding the role of these memory B cells in the peripheral blood of SP patients. What is the antigen specificity of these memory B cells? Do they target periodontal bacteria in the context of chronic inflammation? Do these memory B cells differentiate into antibody-secreting plasma cells? Do these peripheral blood memory B cells emigrate from the gingival tissue, where they have been educated, or are these cells in transit?

Another important observation is the association between the higher level of memory B cells in the peripheral blood and the severity of periodontitis. Relapse after B cell-depleted therapy correlating with the preferential reconstitution of memory B cells was previously observed in autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis [33–35]. When compared with that of several autoimmune diseases, the percentage of CD27<sup>+</sup> memory B cells remained higher in SP (42.7±11.6% for SP patients, 29.4±11.3% for NoP controls, 29.9±19.8% for patients with rheumatoid arthritis (n = 52), 24.9±19.9% for patients with primary Sjögren's syndrome (n = 48) and 40.2±21.8% for patients with SLE (n = 50), personal data). Consequently, further examination of this memory compartment can yield informative metrics of the disease. To some extent, the periodontal status should be evaluated in patients with autoimmune diseases.

Another B cell subset previously reported in autoimmune diseases [36] because of its association with the production of autoantibodies was identified in periodontitis. This B cell subset referred as to autoreactive CD5<sup>+</sup> B cells was inconsistently reported in periodontitis patients. Whereas some groups [37,38] reported large numbers of CD5<sup>+</sup> B cells in the peripheral blood of patients with advanced periodontitis compared with the controls, others [39] found no difference.

All these studies characterise CD5<sup>+</sup> B cells by the sole expression of CD5. However, in mice, these autoreactive B cells, also called B1, were further subdivided into B-1a (CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) and B-1b (CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) cells [40], which are developmentally, phenotypically and functionally distinct, but are localised in similar anatomical sites as the pleural and peritoneal cavities. Recently, Griffin et al. found that a small subset of human peripheral CD20<sup>+</sup> B cells expressing

CD43 and CD27 recapitulated the key functional characteristics of murine B1 cells [19] and demonstrated that only the CD11b<sup>+</sup> B1 cells in humans primarily secrete antibody and the CD11b<sup>+</sup> B1 cells spontaneously produce IL-10 and suppress T-cell activation [21]. Consequently, the latter B1 subset could be considered as regulatory B cells. We reported here a large decrease in the CD11b<sup>+</sup> B cell subset in SP patients. Interestingly, two recent studies demonstrated that IL-10-producing regulatory B cells, when transferred in mice, reduced periodontal bone loss [41,42]. Then, a decrease in regulatory CD11b<sup>+</sup> B1 cells could skew the immune response into an aggravating progression of periodontal disease. Consequently, similar to the abnormal distribution of switched memory B cells, CD11b<sup>+</sup> B1 cell distribution could be monitored in SP patients and used as a key marker of the disease status.

B cells express RANKL, a key molecule involved in osteoimmunology and bone resorption in periodontitis [13,43]. However, only some individuals express RANKL in all B cell subsets while others lack RANKL expression in all B cell subsets. Consequently, the variability in RANKL expression between individual patients deserves further investigations. RANKL is also known for its role in controlling the plasticity of the immune system and secondary lymph node organization [44,45]. B cells appear to be an active regulator of the RANK/RANKL/OPG axis [43], and activated B cells promote osteoclastogenesis [46]. Interestingly, we observed that activated CD25<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup> B cells were predominant in SP in comparison with the NoP controls. The activated B cells express higher levels of RANKL. Therefore, the composition of lymphocyte subpopulations is crucial for osteoclastogenesis in periodontitis. Moreover, anti-B cells therapy leads to a reduction of bone resorption in RA and seems to be beneficial in improving periodontitis [14]. In RA, activation through BCR and CD40 induces switched memory B cells to express RANKL and leads to the activation of osteoclastogenesis [47]. A similar mechanism could be suspected in periodontitis and could explain the general increase in the observed RANKL expression on B cells in our study. Indeed, B cells have been reported as the main source of RANKL in periodontitis [13].

This pilot study highlights that SP is associated with an increase in memory B cells in peripheral blood and that this association could define a new signature of SP. Nevertheless, further investigations with a larger cohort of patients could elucidate if the analysis of the memory B cell compartment distribution could reflect the disease activity and be a reliable marker for its prognosis. This information, in connection with the percentage of circulating B1 cells, could define an interesting complementary marker that could be analysed (ratio of memory B cells to B1 cells) before and after the treatment to check the response to treatment and disease evolution.

## Supporting information

**S1 Table.** This is the STROBE\_checklist.  
(DOCX)

**S1 Fig.** This is the complete and detailed plan for the conduct and analysis of the LBPARO trial that the ethics committee approved before the trial began (in French).  
(PDF)

**S2 Fig.** This is a translation in English of the trial as described in clinicaltrial.gov website.  
(PDF)

**S3 Fig.** This is the ethics committee review board approval of the study (in French).  
(PDF)



## Acknowledgments

We are grateful to Geneviève Michel and Simone Forest for their help typing of the paper.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Sylvie Boisramé, Jacques-Olivier Pers.

**Data curation:** Julien Demoersman, Camille Framery, Sylvie Boisramé.

**Formal analysis:** Julien Demoersman, Pierre Pochard, Camille Framery, Quentin Simon, Assem Soueidan, Jacques-Olivier Pers.

**Funding acquisition:** Jacques-Olivier Pers.

**Investigation:** Julien Demoersman, Camille Framery, Jacques-Olivier Pers.

**Methodology:** Assem Soueidan, Jacques-Olivier Pers.

**Project administration:** Jacques-Olivier Pers.

**Resources:** Pierre Pochard, Quentin Simon, Sylvie Boisramé, Jacques-Olivier Pers.

**Software:** Pierre Pochard.

**Supervision:** Assem Soueidan, Jacques-Olivier Pers.

**Validation:** Julien Demoersman, Pierre Pochard, Quentin Simon, Jacques-Olivier Pers.

**Writing – original draft:** Julien Demoersman, Jacques-Olivier Pers.

**Writing – review & editing:** Julien Demoersman, Pierre Pochard, Camille Framery, Quentin Simon, Sylvie Boisramé, Assem Soueidan, Jacques-Olivier Pers.

## References

1. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol* 2014; 35(1):3–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001> PMID: 24269668
2. Rethman MP. Inflammation in chronic periodontitis and significant systemic diseases. *J Calif Dent Assoc* 2010; 38(4):247–257. PMID: 20509364
3. Goldie MP. The relationship of inflammation to systemic diseases and chronic periodontitis. *Int J Dent Hyg* 2010; 8(3):253–255. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2010.00462.x> PMID: 20624198
4. Berthelot JM, Le Goff B. Rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Joint Bone Spine* 2010; 77(6):537–541. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2010.04.015> PMID: 20646949
5. Hugoson A, Norderud O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *J Clin Periodontol* 2008; 35(8 Suppl):338–345. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01279.x> PMID: 18724861
6. Taylor JJ. Protein biomarkers of periodontitis in saliva. *ISRN Inflamm* 2014; 2014:593151. <https://doi.org/10.1155/2014/593151> PMID: 24944840
7. Donati M, Liljenberg B, Zitzmann NU, Berglundh T. B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions. *J Periodontol Res* 2009; 44(5):683–688. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01178.x> PMID: 19453855
8. Kim YC, Ko Y, Hong SD, Kim KY, Lee YH, Chae C, et al. Presence of Porphyromonas gingivalis and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. *Oral Dis* 2010; 16(4):375–381. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01649.x> PMID: 20233323
9. Berglundh T, Donati M, Zitzmann N. B cells in periodontitis: friends or enemies? *Periodontol* 2000 2007; 45:51–66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2007.00223.x> PMID: 17850448
10. Zouali M. The emerging roles of B cells as partners and targets in periodontitis. *Autoimmunity* 2017; 50(1):61–70. <https://doi.org/10.1080/08916934.2016.1261841> PMID: 28013554
11. Vadasz Z, Haj T, Kessel A, Toubi E. B-regulatory cells in autoimmunity and immune mediated inflammation. *FEBS Lett* 2013; 587(13):2074–2078. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.023> PMID: 23707422

12. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(6):457–475. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.06.004> PMID: 15561602
13. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006; 169(3):987–998. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060180> PMID: 16936272
14. Coat J, Demoersman J, Beuzit S, Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Saraux A, et al. Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol* 2015; 42(9):817–823. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12433> PMID: 26205081
15. Harada Y, Han X, Yamashita K, Kawai T, Eastcott JW, Smith DJ, et al. Effect of adoptive transfer of antigen-specific B cells on periodontal bone resorption. *J Periodontol Res* 2006; 41(2):101–107. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00839.x> PMID: 16499712
16. Oliver-Bell J, Butcher JP, Malcolm J, MacLeod MK, Adrados Planell A, Campbell L, et al. Periodontitis in the absence of B cells and specific anti-bacterial antibody. *Mol Oral Microbiol* 2015; 30(2):160–169. <https://doi.org/10.1111/omi.12082> PMID: 25219939
17. Baker PJ, Boutaugh NR, Tiffany M, Roopenian DC. B Cell IgD Deletion Prevents Alveolar Bone Loss Following Murine Oral Infection. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 2009:864359. <https://doi.org/10.1155/2009/864359> PMID: 19859584
18. Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2012; 83(12):1449–1454. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.110664> PMID: 22420873
19. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-. *J Exp Med* 2011; 208(1):67–80. <https://doi.org/10.1084/jem.20101499> PMID: 21220451
20. Thorbert-Mros S, Larsson L, Berglundh T. Cellular composition of long-standing gingivitis and periodontitis lesions. *J Periodontol Res* 2015; 50(4):535–543. <https://doi.org/10.1111/jre.12236> PMID: 25330403
21. Griffin DO, Rothstein TL. Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. *Mol Med* 2012; 18:1003–1008. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00203> PMID: 22634719
22. Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Scialabba G, Candore G, Lio D, et al. B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mech Ageing Dev* 2003; 124(4):389–393. PMID: 12714244
23. Bulati M, Caruso C, Colonna-Romano G. From lymphopoiesis to plasma cells differentiation, the age-related modifications of B cell compartment are influenced by "inflamm-aging". *Ageing Res Rev* 2017; 36:125–136. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.04.001> PMID: 28396185
24. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev* 2011; 10(3):330–335. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.08.004> PMID: 20728581
25. Kolar GR, Mehta D, Wilson PC, Capra JD. Diversity of the Ig repertoire is maintained with age in spite of reduced germinal centre cells in human tonsil lymphoid tissue. *Scand J Immunol* 2006; 64(3):314–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01817.x> PMID: 16918701
26. Buffa S, Pellicano M, Bulati M, Martorana A, Goldeck D, Caruso C, et al. A novel B cell population revealed by a CD38/CD24 gating strategy: CD38(-)CD24 (-) B cells in centenarian offspring and elderly people. *Age (Dordr)* 2013; 35(5):2009–2024. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9488-5> PMID: 23129025
27. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* 2010; 162(2):271–279. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04206.x> PMID: 20854328
28. Mahanonda R, Champaboon C, Subbalekha K, Sa-Ard-Iam N, Rattanathammatada W, Thawana-phong S, et al. Human Memory B Cells in Healthy Gingiva, Gingivitis, and Periodontitis. *J Immunol* 2016; 197(3):715–725. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600540> PMID: 27335500
29. Nakajima T, Amanuma R, Ueki-Maruyama K, Oda T, Honda T, Ito H, et al. CXCL13 expression and follicular dendritic cells in relation to B-cell infiltration in periodontal disease tissues. *J Periodontol Res* 2008; 43(6):635–641. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01042.x> PMID: 18624951
30. Abe T, AlSarhan M, Benakanakere MR, Maekawa T, Kinane DF, Cancro MP, et al. The B Cell-Stimulatory Cytokines BlyS and APRIL Are Elevated in Human Periodontitis and Are Required for B Cell-Dependent Bone Loss in Experimental Murine Periodontitis. *J Immunol* 2015; 195(4):1427–1435. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500496> PMID: 26150532

31. Badr G, Borhis G, Lefevre EA, Chaoul N, Deshayes F, Dessirier V, et al. BAFF enhances chemotaxis of primary human B cells: a particular synergy between BAFF and CXCL13 on memory B cells. *Blood* 2008; 111(5):2744–2754. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-081232> PMID: 18172003
32. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131(4):959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046> PMID: 23465663
33. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54(2):613–620. <https://doi.org/10.1002/art.21617> PMID: 16447239
34. Anolik JH, Barnard J, Owen T, Zheng B, Kemshetti S, Looney RJ, et al. Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum* 2007; 56(9):3044–3056. <https://doi.org/10.1002/art.22810> PMID: 17763423
35. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, Bertias G, Papadimitrakaki E, Raptopoulou A, et al. Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(4):R131. <https://doi.org/10.1186/ar2798> PMID: 19715572
36. Youinou P, Mackenzie L, le Masson G, Papadopoulos NM, Jouquan J, Pennec YL, et al. CD5-expressing B lymphocytes in the blood and salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 1988; 1(2):185–194. PMID: 3075461
37. Afar B, Engel D, Clark EA. Activated lymphocyte subsets in adult periodontitis. *J Periodontol Res* 1992; 27(2):126–133. PMID: 1372351
38. Berglundh T, Liljenberg B, Tarkowski A, Lindhe J. The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29(4):281–286. PMID: 11966924
39. Sugawara M, Yamashita K, Yoshie H, Hara K. Detection of, and anti-collagen antibody produced by, CD5-positive B cells in inflamed gingival tissues. *J Periodontol Res* 1992; 27(5):489–498. PMID: 1383487
40. Stall AM, Adams S, Herzenberg LA, Kantor AB. Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 651:33–43. PMID: 1376053
41. Wang Y, Yu X, Lin J, Hu Y, Zhao Q, Kawai T, et al. B10 Cells Alleviate Periodontal Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Infect Immun* 2017; 85(9). <https://doi.org/10.1128/IAI.00335-17> PMID: 28652308
42. Yu P, Hu Y, Liu Z, Kawai T, Taubman MA, Li W, et al. Local Induction of B Cell Interleukin-10 Competency Alleviates Inflammation and Bone Loss in Ligature-Induced Experimental Periodontitis in Mice. *Infect Immun* 2017; 85(1). <https://doi.org/10.1128/IAI.00645-16> PMID: 27795360
43. Liu H, Luo T, Tan J, Li M, Guo J. Osteoimmunology' Offers New Perspectives for the Treatment of Pathological Bone Loss. *Curr Pharm Des* 2017. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170511124459> PMID: 28494718
44. Hess E, Duheron V, Decossas M, Lezot F, Berdal A, Chea S, et al. RANKL induces organized lymph node growth by stromal cell proliferation. *J Immunol* 2012; 188(3):1245–1254. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101513> PMID: 22210913
45. Sugiyama M, Nakato G, Jinnohara T, Akiba H, Okumura K, Ohno H, et al. Expression pattern changes and function of RANKL during mouse lymph node microarchitecture development. *Int Immunol* 2012; 24(6):369–378. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs002> PMID: 22354913
46. Choi Y, Woo KM, Ko SH, Lee YJ, Park SJ, Kim HM, et al. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31(7):2179–2188. PMID: 11449372
47. Ota Y, Niino H, Ota S, Ueki N, Tsuzuki H, Nakayama T, et al. Generation mechanism of RANKL(+) effector memory B cells: relevance to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2016; 18:67. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0957-6> PMID: 26980135

## Résumé article 4

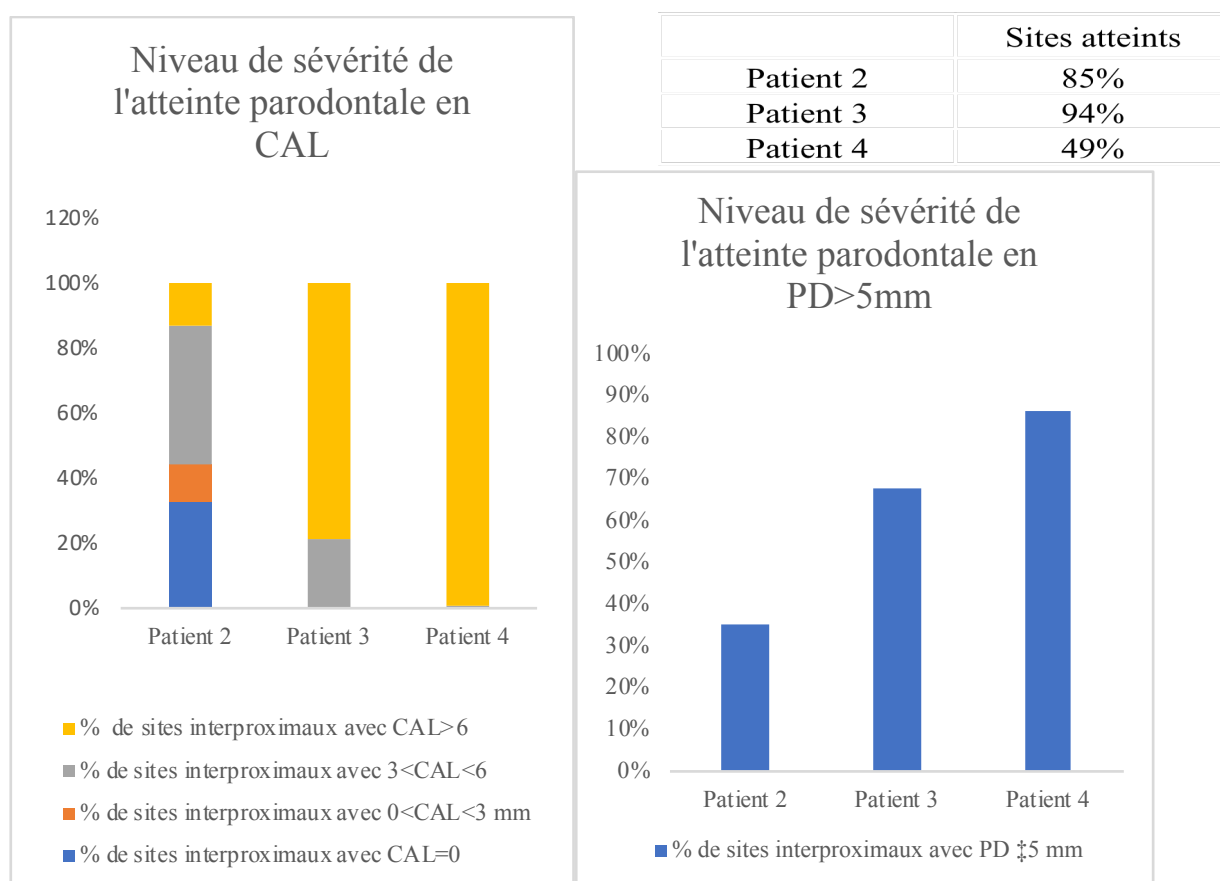
Cet article expose les premiers résultats de l'étude pilote LBParo. Il porte sur les profils immunologiques LB et LB1 circulants chez les patients ayant une SP. L'étude consiste en une étude phénotypique des différentes populations de LB et LB1 dans le sang total de 15 sujets atteints de parodontite sévère (SP), comparée à 13 sujets sains (NoP). L'expression de RANKL sur les différentes sous-populations de LB circulants a été également explorée : une expression relativement plus élevée pour toutes les populations de LB, et plus particulièrement pour les LB activés (CD69<sup>+</sup>) a été observée. Les résultats mettent en avant des modifications systémiques dans les SP, notamment une augmentation des LB mémoires switchés (Sw) et une diminution des LB1 CD11b<sup>+</sup> circulants. Les SP sont donc caractérisées par une distribution altérée des LB dans un contexte d'inflammation systémique sévère.

#### 4- Résultats non présentés dans l'article

##### a- Matériels et méthodes

L'étude sur les populations de LT sanguins a été effectuée sur les mêmes groupes de patients (15 sujets SP vs 13 sujets NoP). Nous avons suivi les mêmes protocoles de préparation des échantillons que pour l'étude sur les populations B et B1 sanguines, et le même type d'analyse statistique.

Nous avons pu récupérer 4 échantillons de gencive chez des patients présentant une parodontite sévère. 3 de ces patients font également partie du groupe SP de l'étude sur le sang. Les caractéristiques cliniques des patients 2, 3 et 4 sont détaillées dans la figure suivante (Figure 3). Le patient 1 n'a pas fait l'objet d'un diagnostic clinique détaillé.



**Figure 3 : Caractéristiques cliniques des patients étudiés**

### *a.1 Analyse par cytométrie en flux des cellules T circulantes*

Le sang a été recueilli pour des analyses biologiques et de cytométrie. Le sang a été analysé un panel dédié aux LT. 200 µl de sang ont été lavés deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate pour éliminer les IgM libres. Ce panel de neuf couleurs comprend : anti-CD45RA conjugué à FITC, anti-RANKL conjugué à PE (Biolegend), anti-CD25 conjugué à ECD, anti-CD27 conjugué à PC5.5, anti-CD62L conjugué à PC7 (Becton Dickinson), anti-CD3 conjugués à AAF750, anti-CD38 conjugué à l'APC, anti-CD8 conjugué à KO et anti-CD4 conjugué au bleu pacifique. Ce panel distingue les différentes sous-populations de LT décrites précédemment (Chapitre II). Tous les anticorps, sauf indication contraire, provenaient de Beckman Coulter. Les globules rouges ont été lysés en utilisant la solution de Versalyse® (Beckman Coulter, Fullerton, CA) avant analyse en cytométrie en flux (Navios ; Beckman Coulter).

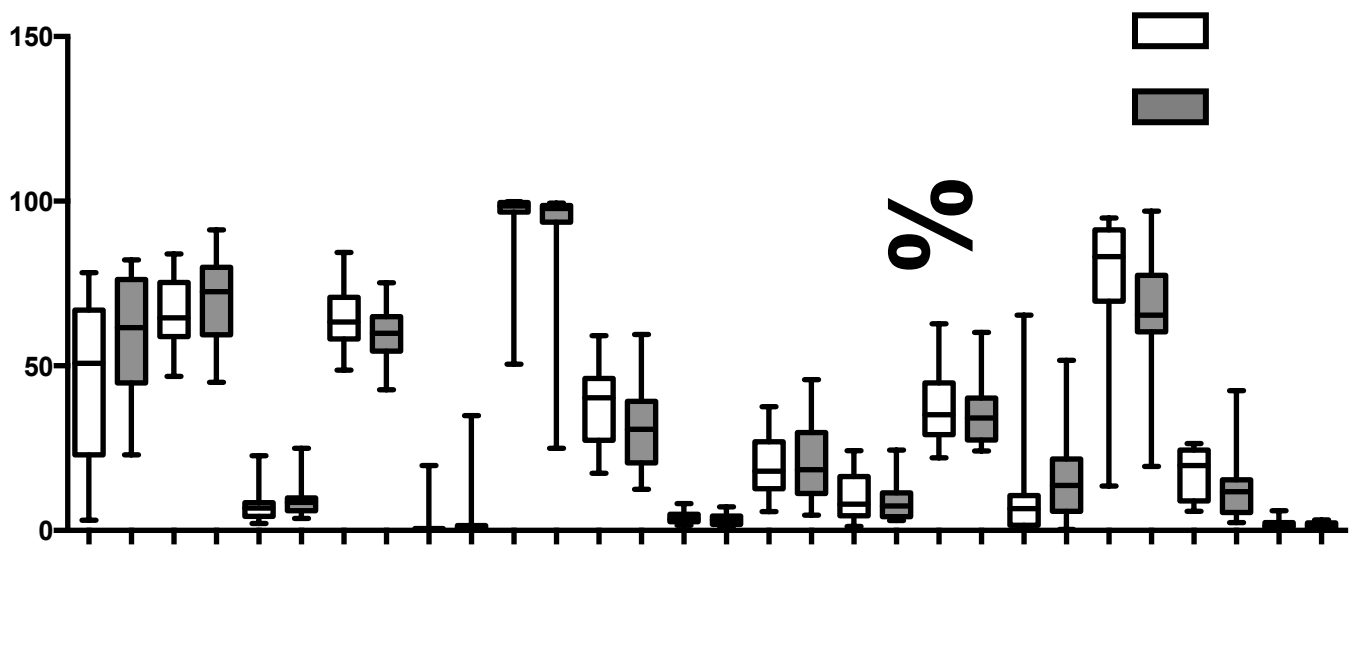
### *a.2 Préparation des échantillons gingivaux*

Les échantillons gingivaux ont été préparés et analysés aussitôt après leur prélèvement (protocole en Annexe 3). Ils sont conservés à 4°C le temps du transport dans du Sérum de Veau Foetal décomplementé. A l'aide d'un bistouri, l'échantillon est clivé en multiples fragments qui sont ensuite récupérés dans du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) et broyés dans un Dounce glass homogenizer stérile, filtré et ensuite rincés dans une solution saline tamponnée au phosphate. L'éluat de gencive va alors être récupéré et préparé pour une analyse en cytométrie en flux.

### *a.3 Analyse des échantillons gingivaux.*

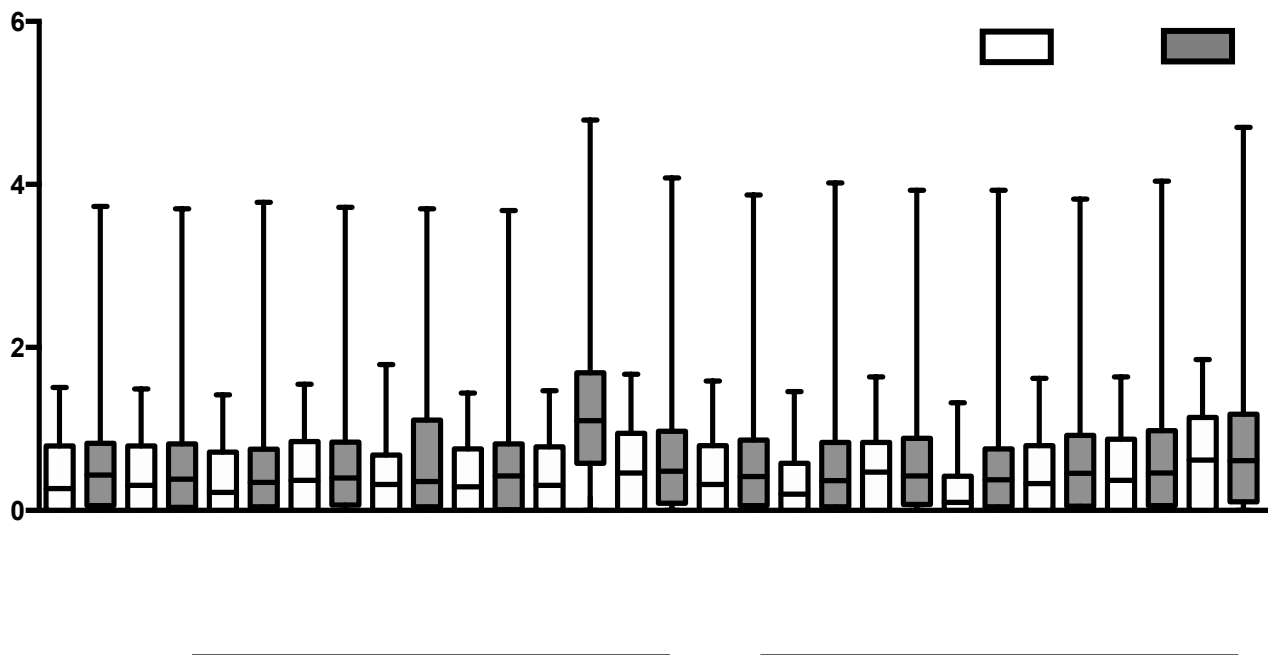
Les éluats de gencive ont été analysés dans un panel de neuf couleurs comprenant un anti-CD45 conjugué à FITC, anti-RANKL conjugué à PE (Biolegend), anti-CD5 conjugué à ECD, anti-CD27 conjugué à PC5.5, anti-CD38 conjugué à PC7 (Becton Dickinson), DRAQ-7 conjugués à AAF750, un anti-IgD conjugué à l'APC et un anti-IgM conjugués au bleu pacifique. Ce panel distingue les différentes sous-populations de LB gingivaux suivant les phénotypes décrits dans le sang.

### **b- Résultats de l'analyse des populations de LT circulants**



**Figure 4 : Distribution des sous populations LT dans les groupes SP et NoP**

Les analyses sur les LT ne montrent aucune différence au niveau du nombre de LT CD4<sup>+</sup> ou de LT CD8<sup>+</sup> entre les patients présentant une SP et NoP (Figure 4). Les LT effecteurs, CD4<sup>+</sup> comme CD8<sup>+</sup>, sont par contre significativement augmentés chez les SP par rapport aux NoP. Les LT CD8<sup>+</sup> ou LT CD4<sup>+</sup> Ac (activés) sont similaires dans les 2 groupes, mais les LT CD4<sup>+</sup> ont une expression de RANKL significativement plus importante que les autres sous-populations de LT (Figure 5).



*Figure 5 : Expression de RANKL sur les sous-populations T*

### **c- Résultats de l'analyse de 4 échantillons de gencive**

Durant notre étude, nous avons pu récupérer 4 échantillons de gencives que nous avons traitées par broyage simple (Annexe 3) chez des patients présentant une SP. Sur ces 4 patients, nous avons obtenu le sang de 3 d'entre eux ; ils font partie du panel des patients présentés dans l'article 4. Les paramètres cliniques correspondant à ces patients sont présentés dans la figure 3.

L'analyse des échantillons de gencive montre chez les patients 1, 2 et 3 des résultats relativement similaires (Figures 6 et 7). Par contre, le patient 4 a un profil assez différent, qui nous a conduit à réaliser une étude complémentaire des populations présentes uniquement chez ce patient (Figure 8).

En effet, les patients 1, 2 et 3 présentent une population mémoire majoritaire. Après élimination des plasmablastes et des LB transitionnels, pour éviter les recouvrements de population, nous avons étudié les différentes sous-populations de LB mémoires gingivaux. Les LB mémoires chez ces patients sont principalement Sw ( $CD27^+IgD^-$ ) ; alors que les populations USw ( $CD27^+IgD^+$ ) sont très minoritaires. Nous notons par contre une importante population mémoire DN ( $CD27^-IgD^-$ ). Ces 2 populations sont principalement IgM<sup>+</sup>. À noter, chez le patient 2, une expression particulièrement importante de CD38 sur les populations Sw



et de manière moins marquée sur les DN. Cette particularité ne se retrouve pas sur les patients 1 et 2, mais est très marquée également chez le patient 4 à la fois sur les Sw et les DN.

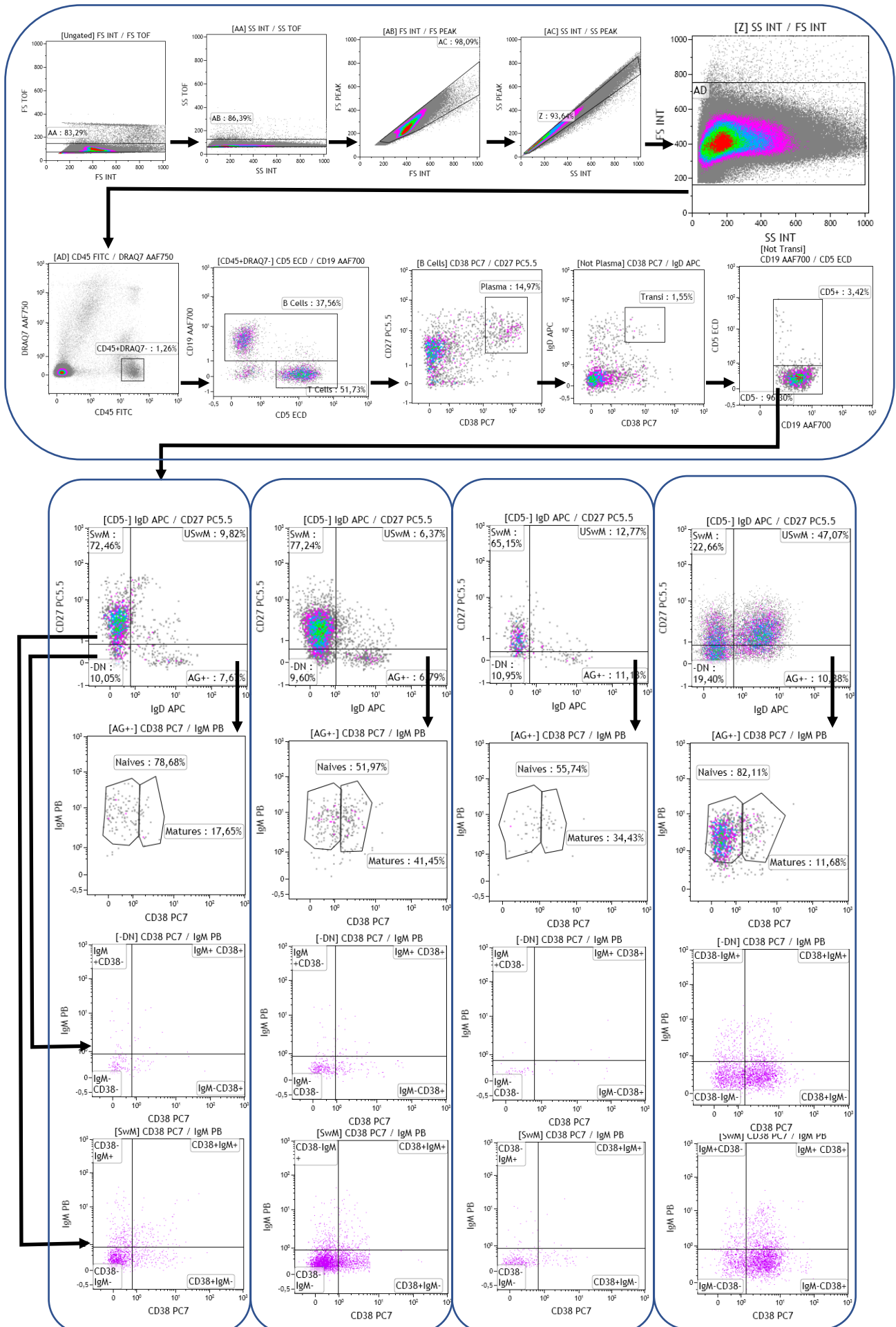
Les LB naïfs sont très peu présents dans les gencives des patients 1, 2 et 3, mais restent plus importants que les LB matures, qui sont très minoritaires. Une proportion plus importante de LB naïfs est observée chez le patient 4. Les LB transitionnels sont quasiment inexistantes chez tous les patients, notamment le patient 4. Les PB représentent environ 15 % des LB sauf chez le patient 4 où il est plus bas.

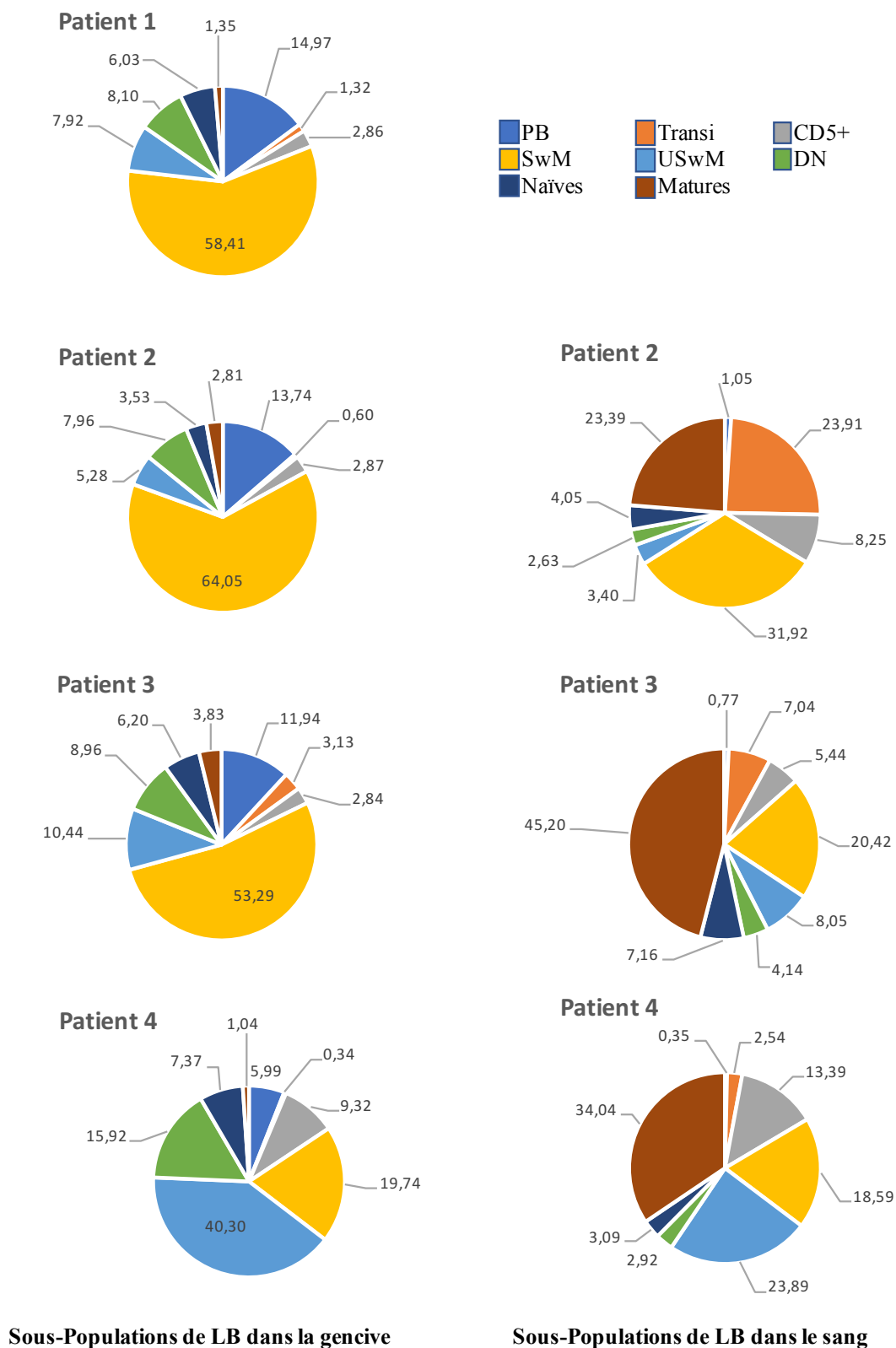
Le profil du patient 4 est caractérisé par une proportion majoritaire de LB USw et une population importante de LB CD5<sup>+</sup> est présente. Les LB mémoires Sw sont minoritaires et proches des valeurs des témoins. Les populations de LB CD5<sup>+</sup> sont bien moins représentées dans les échantillons des patients 1, 2 et 3 (2-3% contre 9,32%). Les LB DN représentent également une proportion plus importante que dans les autres échantillons (8-10% contre 15,92%), alors que les Sw sont bien moins représentés que pour les autres échantillons (plus de 50% des LB présents chez les patients 2 et 3, contre 19,74% chez le patient 4).

D'un point de vue clinique, le patient 4 a l'atteinte parodontale la plus sévère de l'ensemble des patients pour qui nous disposons à la fois du sang et de la gencive (Figure 5). Il s'agissait d'une femme de 37 ans au moment du prélèvement qui ne fumait pas. Les patients 2 et 3 étaient par contre fumeurs et avaient respectivement 44 et 66 ans.

Pour l'ensemble des échantillons, l'expression de RANKL en IMF (intensité moyenne de fluorescence), souvent inférieure à 1, ce qui peut correspondre à une expression membranaire quasi nulle.

Les profils sanguins des patients correspondant aux échantillons présentent des similarités avec les profils gingivaux chez les 3 patients (2, 3, et 4), excepté au niveau des LB matures naïfs qui sont très peu présents dans les tissus gingivaux. Les proportions de LB DN sont similaires, d'après notre étude sur le sang, aux populations témoins et les LB mémoires sont augmentés. Le patient 4 présente également une importante population de LB CD5<sup>+</sup> circulants, contrairement aux deux autres.

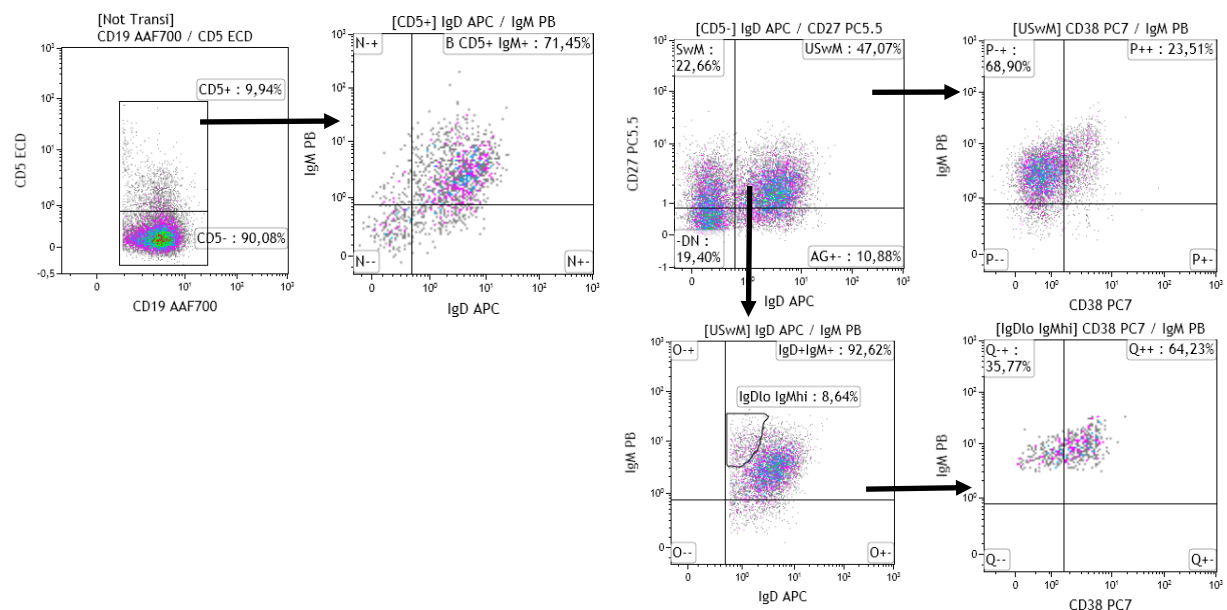




**Figure 7 : Comparaison sous-populations de LB dans la gencive et le sang**

Les proportions de LB naïfs sont similaires entre le sang et la gencive pour les patients 2 et 3 alors qu'elle semble être moins importante dans le sang et que dans les gencives, notamment chez le patient 4.

L'analyse des LB  $CD5^+$  dans les gencives montre qu'ils sont majoritairement  $IgM^+IgD^+$  et que cette population représente 6,66% de l'ensemble des LB gingivaux (Figure 8). Les LB USw sont également majoritairement  $IgD^+IgM^+$  et une population  $IgD^{lo}IgM^{hi}$  semble se détacher et représente 3,48% des LB. Les LB USw sont majoritairement  $CD38^-$ , mais la population  $IgD^{lo}IgM^{hi}$  est également majoritairement  $CD38^+$ .



## Discussion

L'étude que nous avons soumise à publication porte sur les LB dans le sang et met en avant une réponse systémique passant par les OLS dans les SP, caractérisée par une augmentation des LB mémoires circulants, notamment Sw. Cette augmentation des LB mémoires est largement supérieure aux valeurs de référence des LB mémoires dans la tranche d'âge de nos groupes témoins et patients [528]. L'analyse des échantillons de gencives met de plus en avant que le profil sanguin est retrouvé au niveau gingival, excepté au niveau des LB matures et transitionnels. Ainsi, l'analyse des sous-populations de LB dans le sang des patients atteints de SP pourrait être un relatif indicateur de la composition des LB dans les gencives.

L'expression de RANKL concernait toutes les sous-populations sanguines de LB et était globalement plus marquée dans les SP, notamment chez les LB activés. Elle n'a pas été par contre retrouvée à la membrane des LB gingivaux.

Par ailleurs, nous avons observé une diminution des LB1 CD11b<sup>+</sup>, LB1 orchestrateurs [323], dans le sang des patients atteints de SP. Un défaut de régulation dans la pathogénie des maladies parodontales sévères pourrait être en cause et le taux de LB1 CD11b<sup>+</sup> pourrait être également un marqueur des SP.

Enfin, les populations LT sont peu touchées par la présence d'une SP, excepté une augmentation des populations effectrices et une expression plus marquée de RANKL sur les LT CD4<sup>+</sup> activés. Cela confirme les précédentes études ayant démontré que les LT, comme les LB étaient sous forme activée et que ces formes étaient les plus susceptibles d'exprimer RANKL dans le sang [529].

### 1- Profils immunologiques des LB dans la gencive et le sang

Nous n'avons pu obtenir que 4 échantillons de gencives exploitables, dont 3 avec une analyse du sang (panel B) concomitante. L'échantillon est trop faible pour conclure, mais les observations réalisées montrent certains aspects qui devront être confirmés ou infirmés dans une étude avec un effectif plus conséquent.

Cette étude a permis de montrer qu'un broyage simple des gencives pouvait permettre de récupérer, dans la plupart des cas, un nombre suffisant de cellules pour les analyser en cytométrie en flux. Cependant, même si un lavage soigneux de l'échantillon a été réalisé, nous ne savons pas si les cellules récupérées étaient principalement extravasculaires ou

intravasculaires, Nous avons fait le choix de ne pas utiliser d'enzyme (collagénase, dyspase) pour limiter les possibles altérations cellulaires liées à l'utilisation de ces enzymes. Cependant, il serait intéressant de développer le protocole utilisé en testant l'utilisation de ces enzymes ou en adaptant une technique de culture 3D d'explants de gencive [530] pour augmenter le rendement de cellules récupérées. De plus, une analyse en immunohistochimie, prévue dans le projet initial, mais non encore effectuée, permettrait de visualiser la situation des sous-populations de LB dans les tissus gingivaux, et de valider leur présence en extravasculaire.

L'étude de ces 4 gencives montre une relative similarité entre les profils sanguins et gingivaux chez l'ensemble des patients. Nous notons cependant que les LB matures sont très faiblement représentés au sein des gencives par rapport aux échantillons sanguins. Cela peut être interprété comme une absence de pénétration des LB matures dans les tissus gingivaux ou une différenciation de ces derniers en LB mémoires au sein des tissus gingivaux. La diminution du pourcentage de LB mature dans le sang des patients SP par rapport aux NoP suggérait déjà une différenciation vers le phénotype mémoire parmi les patients SP. De même, les LB transitionnels sont plus fortement représentés dans le sang (5-10%), surtout chez le patient 2 (23, 91%) alors que leur proportion est très faible dans les gencives (0-3 %).

Comme dans le sang, les LB mémoires Sw représentent une proportion importante des LB. Ils sont même majoritaires chez les patients 1, 2 et 3. Ce caractère est plus marqué dans les gencives que dans le sang et nous notons également une population DN importante dans la gencive, soulignant une éventuelle étape de maturation au sein des tissus. En effet, nous avons détecté une augmentation des LB mémoires Sw dans le sang, mais pas des LB DN ; ces derniers sont souvent associés à une maturation supplémentaire des LB mémoires Sw, en présence d'IL-6, dans les CG et à une augmentation de l'affinité à l'Ag [531]. Cette augmentation tissulaire des LB DN pourrait-elle être associée à la formation de CG au sein de la gencive, et donc plus particulièrement à la mise en place d'un OLT ? Le patient 4 serait donc plus susceptible de développer ce type de structure vu son profil immunologique, à la fois dans la gencive et le sang.

Ce dernier patient présente en effet un profil immunologique très différent au sein de la gencive et du sang des autres patients. Cependant, la proportion de DN est la plus élevée des 4 patients alors qu'elle est très faible dans le sang de ce patient. La répartition des LB mémoires sanguins diffère des résultats globaux de notre étude : les LB mémoires Sw

(18,5%) sont moins importants que les LB Mémoires USw (23,9%). La proportion moyenne des LB mémoires Sw dans l'ensemble de la population SP (23,1+/-8,0%) était plus importante que chez les témoins (16+/-6%), et les valeurs rapportées chez ce patient sont similaires à celles rapportées chez les témoins. Par contre, la proportion des LB mémoires USw (23,9%) chez ce patient est largement supérieure à la proportion moyenne rapportée dans notre étude dans l'ensemble des SP et des NoP (respectivement 15,5 +/-11,5% et 10,3+/-4,9%). Cette différence de répartition est également retrouvée dans la gencive, avec une proportion quasi similaire de LB mémoires Sw, mais une augmentation gingivale des LB mémoires USw. Les LB mémoires USw correspondent aux LB mémoires qui n'ont pas subi de commutations de classe ou d'hypermutation somatique ; ils dérivent des LB-ZM de la rate [380, 532] et ces cellules dans la gencive pourraient être considérées comme des LB-ZM-like. Une population IgD<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup> se détache dans l'échantillon sanguin et pourrait correspondre à ces LB-ZM-like. Elle est particulièrement activée (CD38<sup>+</sup>), contrairement au reste de la population USw.

La réponse B innée semble ainsi proportionnellement plus importante que la réponse adaptative. Une partie des LB mémoires USw gingivaux pourraient être constitués par des LB1 CD5<sup>-</sup>. Nous n'avons pas de marqueurs discriminants entre LB1 et LB2 dans notre panel gingival et les populations LB1 CD5<sup>-</sup> sont également CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> [323, 324]. Ainsi une proportion de cette population pourrait correspondre aux LB1 CD11b<sup>+</sup> gingivaux. Dans le sang du patient 4, le taux de LB1 CD11b<sup>+</sup> circulants est un des plus bas des échantillons, même s'il représente 80% de l'ensemble des B1 dans le sang. Enfin, chez ce patient, la proportion de LB CD5<sup>+</sup> est importante à la fois dans la gencive et dans le sang. L'expression d'IgM est majoritaire et cette population correspond probablement aux LB1 CD5<sup>+</sup> préalablement décrits depuis 1992 [294] dans les parodontites sévères et généralisées. De manière globale, nos résultats sont plus cohérents avec ceux de Sugarawa et Aramaki, qui n'avaient pas relevé, comme nous, d'augmentation des LB CD5<sup>+</sup> circulants [295, 296]. Cependant, ce patient 4 a un profil immunologique soulignant probablement la présence de LB autoréactifs aussi bien gingivaux que circulants, comme pour Afar et Berglundh [294, 297].

Le contexte clinique du patient 4 montre une propension à avoir une atteinte importante (Figure 5) et rapide, suggérant ainsi que son profil immunologique particulier, sanguin comme gingival, pourrait être associé aux destructions tissulaires observées.

Cela souligne également que les populations SP, selon la classification de Page et Ecke [48, 49] ne sont pas homogènes et qu'au sein des patients SP au moins deux profils immunologiques peuvent se retrouver :

- **Profil SP1** : LB mémoires Sw augmentés, LB1 CD11b<sup>+</sup> diminués, et LB mémoires USw et LB CD5<sup>+</sup> inchangés, traduisant une réponse immunitaire inflammatoire et de plus en plus spécialisée.
- **Profil SP2** : LB mémoires USW, LB naïfs et LB CD5<sup>+</sup> augmentés, LB1 CD11b<sup>+</sup> augmentés, et LB mémoires Sw inchangés, traduisant une réponse immunitaire moins spécialisée, ou une déficience de la réponse adaptative et une régulation déficiente des réponses inflammatoires, mais également auto-immunes.

Les analyses effectuées sont une image ponctuelle du profil immunologique des différents patients étudiés. D'autres recherches sont à effectuer pour savoir si ces profils sont liés aux caractéristiques du patient et de sa parodontite, ou si ces profils représentent différents stades d'évolution d'une parodontite qui pourraient être présents chez un même patient.

## **2- Les LB mémoires sont augmentés dans le sang et les gencives des patients présentant une parodontite sévère**

Les altérations du compartiment B mémoire sanguin sont des caractéristiques des pathologies auto-immunes et des pathologies inflammatoires chroniques. Les parodontites sont des pathologies inflammatoires chroniques, mais elles peuvent également avoir un caractère auto-immun.

Plusieurs études avaient été réalisées depuis les années 1980 pour voir si les parodontites étaient associées à une modification des phénotypes sanguins des LB et des LT, sans montrer de différences au niveau des populations lymphocytaires en général [87, 289, 297, 429], excepté au niveau des LB CD5<sup>+</sup> circulants [294, 295, 297]. Aucune étude avant nous, excepté une [533], n'avait mis en avant une augmentation des LB mémoires sanguins chez les SP.

### **a- Pathologies où la distribution des populations sanguines de lymphocytes B est altérée**

Les populations de LB, notamment des LB mémoires, sont altérées au niveau sanguin dans un certain nombre de pathologies inflammatoires chroniques et de maladies auto-immunes. Ainsi, dans le syndrome de Gougerot-Sjögren, ainsi que dans l'AIR (rétinopathie auto-immune) une diminution des LB mémoires et une augmentation des LB naïfs sont observées [534, 535], avec une diminution des LB mémoires DN et des LB mémoires Sw.



D'autres pathologies auto-immunes comme la PR ou le SLE sont associés par contre à une augmentation des LB mémoires DN [536-538], mais elles sont également associées à une inflammation chronique. Dans les SLE, aucune différence n'est trouvée sur les LB naïfs et une augmentation des plasmablastes circulants est rapportée [536].

Une lymphopénie sélective et des altérations des sous-populations de LB sont également décrites dans la pseudo-polyarthrite rhizomélique [539]. L'obésité est elle-même associée à une diminution des LB mémoires [540].

Enfin, l'uvéïte et la pré-éclampsie qui sont des maladies inflammatoires sont associées à une augmentation des LB mémoires [535, 541]. L'uvéïte est également caractérisée par une augmentation des plasmablastes, une diminution des LB naïfs et augmentation des LB mémoires Sw et des LB mémoires DN [535].

Il semblerait que le caractère inflammatoire chronique amène à une augmentation des LB mémoires dans le sang des patients et que le caractère auto-immun amène à une diminution de ces derniers. Cette dichotomie n'est pas aussi évidente, car la frontière entre maladies auto-immunes et maladies inflammatoires chroniques est floue. De plus, nous sommes dans une situation dynamique ; les poussées inflammatoires dans les pathologies auto-immunes pourraient être associées à des modifications des profils immunologiques des patients. L'augmentation des LB mémoires dans notre étude et celle de Schmidt et al. en 2014 [533] semble donc signifier le caractère inflammatoire chronique des maladies parodontales, et non un aspect auto-immun.

## **b- Études sur les profils sanguins des patients atteints de parodontites**

Notre étude est la deuxième qui montre une augmentation des LB mémoires dans le sang des patients atteints de parodontite. En 2014, Schmidt et al, étudièrent la répartition des différentes sous-populations de LB et de LT dans des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de patients atteints de parodontites [533]. Leurs échantillons étaient constitués de 14 patients sains, comparés à 11 patients atteints de parodontite chronique et 15 patients atteints de parodontite agressive, diagnostiqués suivant les critères de la classification d'Armitage 1999 [26]. Ils étudièrent également la composition de la flore bactérienne parodontale de ces patients et analysèrent la production cytokinique par les LB et les LT récupérés de ces patients, suite à une stimulation par des LPS-*Pg*.

Ils mirent en évidence dans les parodontites chroniques, une augmentation des LB mémoires USw, associée à un taux élevé d'IL-1 $\beta$ . *Pg* était présent dans les différentes formes

de parodontites, sans que le profil bactérien puisse être associé à un profil immunologique particulier. Cette augmentation n'était pas retrouvée sur les patients atteints de parodontite agressive.

Ce résultat marque une différence notable entre les parodontites chroniques et agressives : les patients avec une parodontite chronique modérée auraient une capacité d'autolimitation de l'inflammation que n'ont pas les patients avec une parodontite agressive et cela limiterait la progression de la maladie [533].

Dans notre étude, nous avons travaillé sur sang total et nos critères de diagnostic sont différents, puisque nous nous sommes basés sur la classification de Page & Ecke [48, 49]. Les parodontites sévères retenues peuvent correspondre à la fois aux parodontites chroniques et aux parodontites agressives, suivant la classification d'Armitage 1999, car le caractère évolutif et les antécédents familiaux ne sont pas retenus par la classification de Page & Ecke. L'augmentation des LB mémoires Sw pourrait être associée à la sévérité de l'atteinte, voire à son ancienneté : les atteintes parodontales décrites par Schmidt et al. étaient chroniques modérées alors que nous avons étudié des atteintes sévères.

D'après les auteurs, l'augmentation des LB mémoires USw est associée à l'IL-1 $\beta$  qui est également très augmentée dans les parodontites chroniques. IL-1 $\beta$  induit la production d'IL-6 qui aboutit à l'activation des LB et au relargage des IgG. Cela induit une forte réponse Ac au niveau systémique, qui est plus importante dans les atteintes modérées. Une réduction de la production d'IgG semble associée avec la sévérité de l'atteinte [542].

Nous pourrions également rajouter que ces deux cytokines induisent le relargage de TNF- $\alpha$  qui a une diffusion systémique importante et qui peut induire un déplacement de la lymphopoïèse en périphérie, dans les OLS [15], augmentant ainsi la production de LB au sein des OLS.

### **c- Différents profils immunologiques de parodontite**

L'étude de nos échantillons de gencives a mis en évidence deux profils immunologiques différents que nous avons appelés SP1 (patient 1, 2, 3) et SP2 (patient 4), caractérisés par un taux élevé de LB CD5<sup>+</sup> et de LB mémoires USw. Ces profils gingivaux sont associés à des profils immunologies sanguins similaires. Les différences entre notre étude et celle de Schmidt et al. [533] montre qu'il existe probablement différents profils immunologiques de parodontites, allant d'une absence de réponse systémique, pouvant être

associée à des atteintes évolutives et sévère, à une réponse systémique permettant une progression plus lente des lésions.

Une proportion élevée de LB mémoires, majoritairement switchés, semble associée à une atteinte parodontale sévère avec une réponse systémique importante, mais délétère. Par contre, l'augmentation des LB CD5<sup>+</sup> et des LB mémoires USw définit un profil immunologique différent, beaucoup moins spécifique à l'Ag et également très délétère.

Ces deux profils ne peuvent pas être considérés comme un profil de parodontite chronique et un profil de parodontite agressive, d'autant plus que le profil SP2 ne correspond pas à une absence de réponse systémique, comme décrite par Schmidt et al. [533], mais à une réponse immunitaire dysfonctionnelle, du même ordre que celui décrit dans les maladies auto-immunes [543]. Il serait donc intéressant de définir des critères d'évolutivité et d'activité objectifs des maladies parodontales afin d'y associer différents profils immunologiques sanguins. Ainsi un ratio LB mémoires Sw/USw sanguin, en fonction des caractéristiques cliniques, pourrait aider au diagnostic et au pronostic d'une atteinte parodontale.

Une étude sur un plus grand échantillon de patient permettrait de déterminer différents profils immunologiques sanguins des patients avec des parodontites et de les associer aux caractéristiques cliniques de ces patients (sévérité, activité...). De plus, nous sommes dans un système dynamique : une étude longitudinale permettrait également de voir si ces profils évoluent dans le temps et s'ils sont modifiés par la réalisation d'un traitement parodontal conventionnel. A terme, l'objectif est de bien cerner aussi bien sur le plan diagnostique que thérapeutique, le type de parodontite d'une part, et la nature de la réponse de l'hôte d'autre part, même si les deux sont interdépendants.

#### **d- Caractéristiques des lymphocytes B mémoires dans les parodontites**

Les 3 sous-populations de LB mémoires semblent associées aux parodontites : USw, Sw et DN. Dans l'étude de Schmidt et al, les populations mémoires circulantes n'étaient pas passées par la voie du CG [533]. Les populations USw, CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>, sont des populations qui ont un rôle essentiel dans la défense contre les bactéries encapsulées [380, 532], comme *Pg*. Elles peuvent être impliquées dans une deuxième voie de diversification des gènes de l'Ig, indépendante des CG, dans la zone marginale, à partir notamment des LB-ZM. Ce phénotype représente l'équivalent circulant des LB-ZM et est impliqué principalement dans les réponses T-indépendantes. Leurs fonctionnalités se rapprochent des LB1 et des LB-ZM, donc d'une réponse innée. Le répertoire des Ig des populations CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> est

polyclonal et est comparable à celui des LB naïfs. Il ne présente aucun signe d'expansions clonales caractéristiques d'une réponse à l'Ag, alors même que les LB CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> ont des Ig mutées. Les LB mémoires USw ne dérivent pas des CG, mais appartiennent à un lignage spécifique qui pré diversifie ses Ig au cours d'un programme de développement, et non au cours d'une réaction immunitaire. Ils pourraient ainsi présenter un répertoire élargi face à des antigènes T-indépendants filtrés dans la zone marginale splénique, et constituer une première ligne de défense vis-à-vis de bactéries encapsulées, grâce à leur capacité à se différencier rapidement en plasmocytes sécrétant des IgM mutées (et des IgG après commutation isotypique). Les TLR ont un rôle important dans le développement et le maintien de l'homéostasie de cette sous-population. L'inflammation et les signaux T-indépendant peuvent induire une prolifération des LB et l'accumulation de mutations somatiques dans les LB immatures. Ainsi l'activation du TLR9 sur un LB immature aboutit à une maturation d'une partie des cellules en LB-ZM (CD27<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) [544], mais les TLR1, 2, 6 et 10 seraient particulièrement impliqués dans le développement et la maintenance des LB CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> [380].

Elles représentent donc une première ligne de défense systémique face au défi bactérien et ces populations peuvent migrer des OLS vers les gencives et former des LB-ZM-like au sein des tissus parodontaux. Dans notre échantillon gingival lié au patient avec une importante population USw, aussi bien sanguine que gingivale (patient 4, profil SP2), nous avons observé la présence d'une population LB-ZM-Like (IgD<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup>) particulièrement activée dans les gencives. Ce type cellulaire pourrait avoir un rôle important dans la mise en place des parodontites. Ces LB pourraient avoir une importante plasticité phénotypique au sein de la gencive, en fonction des signaux inflammatoires et des signaux perçus par les TLR. Enfin, leur affinité est variable et peu contrôlée, donc ils pourraient constituer un pool de LB autoréactifs. Ils sont également très sensibles aux interactions C3d/CD21 ; *Pg* dérégule le complément et aboutit à une accumulation de C3d qui pourrait être un facteur expliquant l'activation et la prolifération locale de LB-ZM-like [545]. Enfin, certains peuvent revenir dans les OLS et subir une commutation de classe et être une source de LB mémoires Sw.

Les LB mémoires Sw sont une population de LB présentant une Ig avec une affinité importante pour l'Ag. La présence d'une réponse adaptative efficace, suite à l'augmentation des LB mémoires, permettrait de limiter l'extension des lésions, sans réussir à la contenir, tant que le biofilm dysbiotique n'est pas désorganisé. Cependant, la proportion de LB mémoires Sw semble plus associée à des lésions sévères et il n'est pas possible de déterminer si l'augmentation de ce type cellulaire a un effet protecteur ou destructeur. Notre étude ne nous

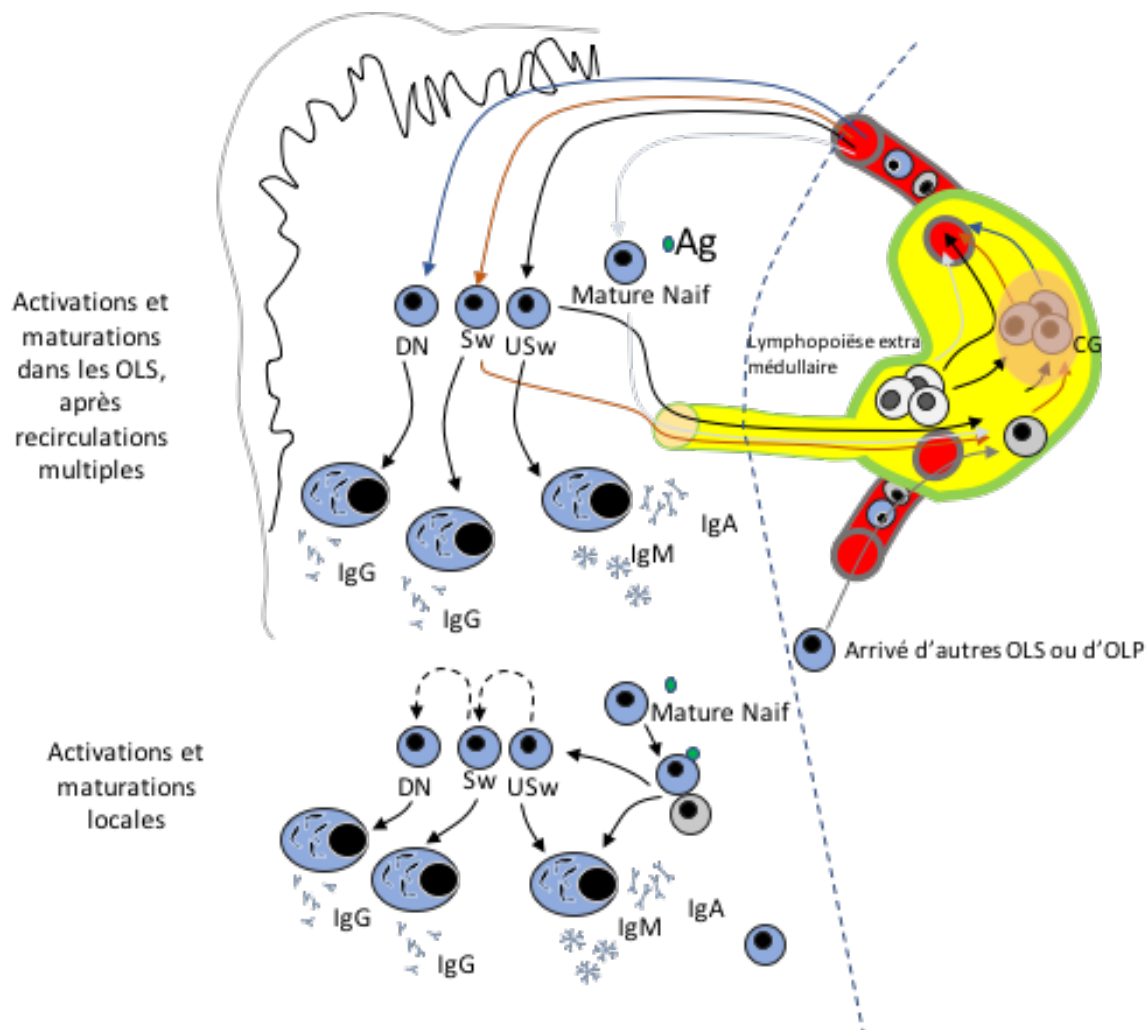
permet pas de connaître le type d'Ig portée, l'Ag ciblé et son affinité. Le passage par le CG dans les OLS limite le caractère autoréactif de ces LB, mais pourraient-ils être porteurs d'Ig responsables de réactions antigéniques croisées entre le soi et le non-soi ? De même, sont-ils produits par la moelle osseuse ou sont-ils issus d'une lymphopoïèse périphérique dans les OLS ? Le risque d'autoréactivité serait alors plus important, car la tolérance est moindre en périphérie. Enfin, lorsqu'ils arrivent dans les tissus parodontaux, leur Ig de surface peut-elle subir des modifications et sont-ils les principales sources des plasmocytes observés dans la gencive ? Il semble nécessaire de clarifier tous ces éléments, pour déterminer le rôle des LB mémoires Sw dans la pathogénie de maladie parodontale.

Les LB DN font partie des LB mémoires, malgré l'absence de CD27 à leur surface. Ils sont issus d'un passage secondaire d'un LB mémoire Sw dans un CG [531, 546]. Nous n'avons pas relevé d'augmentation particulière des LB mémoires DN dans le sang (5%), cependant, dans les gencives, ils représentent une part non négligeable (8%), notamment chez le patient 4 (15%).

La fonction des LB DN est méconnue, mais ils appartiennent au compartiment mémoire en raison d'un nombre important d'hypermutations somatiques et sont réputés pour induire une réponse LT et la production de cytokines proinflammatoires [531, 546]. La plupart des DN ont subi la commutation de classe. Il est possible que ces cellules B soient liées à la production d'Ac de plus haute affinité suite à plusieurs passages dans les GC, soulignant ainsi une recirculation des LB des tissus du système lymphatique à travers le sang [538].

Ainsi, il semblerait que les multiples circulations des LB mémoires dans les parodontites amènent à une augmentation progressive de l'affinité des Ig produites dans le but de maintenir l'homéostasie. Dans les PR, les LB mémoires USw sont particulièrement diminués au profit des LB mémoires Sw, soulignant ce gain d'affinité important [538]. Les LB mémoires Sw semblent par ailleurs exprimer plus de RANKL, comme dans les PR [157], ce qui pourrait être un élément qui expliquerait l'augmentation de la perte osseuse, et donc la sévérité des atteintes en même temps que l'augmentation des LB mémoires Sw. Au sein de tissus parodontaux, une partie des LB mémoires Sw pourraient évoluer en LB DN via une commutation isotypique locale. La différenciation des LB en LB mémoires DN (IgD-CD27-) est modulée par l'IL-6R et le TCZ et les anti-TNF- $\alpha$  ont été rapportés comme capables de réduire cette population mémoire, très présente dans les PR, à des niveaux normaux [508, 538].

De plus amples recherches sont nécessaires pour clarifier le rôle de chacune de ces populations mémoires et leur rôle dans la pathogénie, en fonction des profils immunologiques sanguins des patients.



**Figure 9 : Activations et évolutions des LB mémoires dans la gencive et les OLS**

### 3- Les LB1 CD11b<sup>+</sup> sont diminués dans le sang des patients présentant une parodontite sévère

Notre étude est la première à mettre en avant une diminution des LB1 CD11b<sup>+</sup> circulants dans les maladies parodontales sévères. Dans les pathologies auto-immunes, notamment dans le SLE, ils sont généralement augmentés [334]. Cette différence renforce l'argument que les patients de notre étude présentent principalement une pathologie inflammatoire ou auto-inflammatoire plutôt qu'une atteinte auto-immune. Cette diminution des LB1 CD11b<sup>+</sup> pourrait être à l'origine d'un déficit de régulation dans les SP.

La diminution des LB1 CD11b<sup>+</sup> dans le sang est-elle associée à une diminution ou à une augmentation dans les gencives ? Actuellement, aucune étude n'a mis en évidence ce type de population dans les gencives ni leur rôle. Ces LB1 peuvent en effet être difficilement rapportés aux LB1a décrits dans la gencive et le sang de patients, car ils sont majoritairement CD5<sup>-</sup> ; ils correspondraient plus aux LB1b chez la souris. Par ailleurs, l'expression d'IL-10 par les LB1 CD11b<sup>+</sup> n'est pas une propriété propre au LB1. En effet, d'autres LB immatures, comme les LBT3 CD27<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>, sont capables, sous stimulation de produire de l'IL-10 et d'être une des sources de LB10 [347]. L'activation des LB10 (CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>) est à l'origine d'une diminution de la perte osseuse [392, 472-474].

Une étude plus approfondie des LB1 CD11b<sup>+</sup> permettrait de déterminer leur présence dans les gencives et leur quantité. Deux situations peuvent alors se présenter :

- Diminution dans les tissus parodontaux : il y a alors un déficit de régulation par les LB1 CD11b<sup>+</sup> qui pourrait participer à l'aggravation de la progression des parodontites. Ce déficit est-il constitutionnel ou induit ? Est-ce un problème de recrutement ou d'autorenouvellement insuffisant ? Moins de LB1 CD11b<sup>+</sup> circulants serait donc un facteur de susceptibilité aux maladies parodontales. Des facteurs génétiques pourraient être en cause, notamment au niveau des mécanismes de migration cellulaire. Un déficit de recrutement des LB1 CD11b<sup>+</sup> pourrait être également associé à des modifications épigénétiques.
- Augmentation dans les tissus parodontaux : une augmentation du chimiotactisme des LB1 CD11b<sup>+</sup>, sans augmentation de l'autorenouvellement en amont, à l'origine d'une diminution dans le sang, ou un développement local dans les tissus peuvent être suspectés. Différents facteurs bactériens (LPS...) ou inflammatoire (IL-10...) peuvent induire une prolifération des LB1 CD11b<sup>+</sup> et une différenciation en différents phénotypes [464]. Dans le SLE, le nombre de LB1 CD11b<sup>+</sup> est augmenté [334]. Ce phénotype peut à la fois activer fortement les LT et l'expression d'IL-10 peut être modulée. L'activation des LT pourrait être relativement plus importante que l'action régulatrice de ce type cellulaire, malgré l'augmentation de cette population.

#### **4- RANKL est présent de manière relativement plus forte sur les populations lymphocytaires**

Notre étude a mis en avant une relative augmentation de l'expression de RANKL sur l'ensemble des sous-populations de LB et de LT sanguins, notamment les lymphocytes

activés. La présence de RANKL sur les lymphocytes activés a été décrite par plusieurs auteurs [477], notamment sur les LB mémoires dans la PR. Les LB mémoires Sw semblent avoir l'expression la plus importante de RANKL. L'expression reste faible et inconstante en fonction des patients, bien qu'il y ait une expression basale chez les témoins sains, mais une augmentation globale de l'expression de RANKL est visible.

L'expression de RANKL sur les LB est souvent décrite, mais les LB sont également sécréteurs d'OPG et expriment également RANK à leur surface, pour certains phénotypes [138, 141, 275, 278, 547]. Ce sont des acteurs importants de l'interface immuno-squelettique qui peuvent donc orienter la balance osseuse, sans et sous condition inflammatoire.

#### **a- Expression des RANKL par les lymphocytes B mémoires switchés dans le sang.**

Les LB mémoires Sw dans la PR sont des sources importantes de RANKL [157, 548]. Ils expriment plus particulièrement RANKL dans le sang périphérique et les LB RANKL<sup>+</sup> sont également CD80<sup>+</sup> et CD86<sup>+</sup>. Après activation du BCR et de CD40, l'expression de RANKL est augmentée chez les LB mémoires Sw. Les cytokines influencent également la sécrétion de RANKL par les LB mémoires Sw : l'IFN- $\gamma$  augmente l'expression de RANKL, mais également de CXCR3, et l'IL-21 la supprime. Le RANKL exprimé, associé au TNF- $\alpha$  facilite ainsi la différenciation ostéoclastique.

Ainsi, le phénotype de LB mémoire SwRANKL<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> serait un effecteur potentiel dans la pathogénie des PR [157].

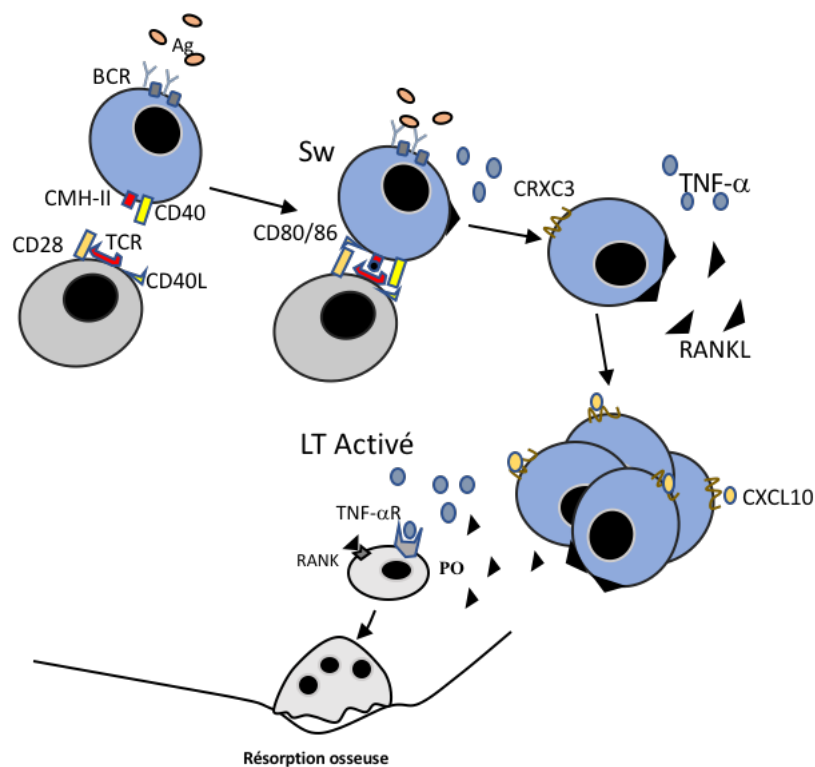
Un mécanisme similaire pourrait être présent dans les tissus parodontaux : les LB sont les principales sources de RANKL [147], mais dans notre étude, nous ne retrouvons pas une sous-population spécifique de LB exprimant RANKL.

Ota et al. en 2016 [157], présentèrent le mécanisme suivant (Figure 10) :

- activation des LB mémoires Sw par le BCR et CD40 : induction de l'expression de RANKL à la membrane (mRANKL)
- augmentation du processus par IFN- $\gamma$  et expression également de CXCR3. Le recrutement est alors facilité dans les sites inflammatoires par le CXCR3, principalement par une interaction avec le CXCL10.
- dans les tissus, le sRANKL est libéré et active les précurseurs ostéoclastiques, en association avec le TNF- $\alpha$  et le MCSF



- l'ostéoclastogénèse est alors induite



**Figure 10 : Induction du phenotype mémoire B Sw  $RANKL^+CXR3^+$  et déclenchement de l'ostéoclastogénèse : d'après [157].**

## **b- Expression de RANKL par les lymphocytes B immatures et naïfs dans le sang**

Paradoxalement, les LB immatures et les LB naïfs semblent aussi concernés par une expression de RANKL plus forte dans les parodontites sévères que chez les sujets sains. Le rôle de RANKL/RANK/OPG sur les LB en cours de développement dans la moelle osseuse est sujet à controverse [141, 142, 271, 277, 549]. L'expression accrue de RANKL sur les LB naïfs et les LB immatures pourrait être un signe de la lymphopoïèse extra médullaire dans les OLS ; l'expression de RANKL sur les LB serait précoce et toucherait ainsi toutes les sous-populations et son expression serait augmentée par l'activation du LB.

L'augmentation de RANKL sur toutes les sous-populations de LB a déjà été rapportée chez les patients séropositifs, notamment les LB activés [547]. L'expression de RANKL sur les LB naïfs était très augmentée chez les patients  $HIV^+$ , et la sécrétion d'OPG, normalement importante dans cette population était diminuée. La balance osseuse est ainsi dérégulée et l'ostéoclastogénèse est augmentée. Cela peut être un des mécanismes expliquant l'association entre HIV et parodontite, avec l'augmentation de l'IL-7 [550-552]. Un recrutement et une prolifération locale des LB naïfs ou un accroissement de leur migration vers les OLS pourrait

être à l'origine d'une diminution de leur sécrétion d'OPG. Cependant, l'OPG reste constant dans les parodontites alors que RANKL augmente [165]. Une compensation insuffisante par les autres types cellulaires exprimant OPG [553], pourrait expliquer ce maintien de l'OPG à un niveau constant.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

Le LB apparaît comme un élément central dans les maladies parodontales et une altération de ce type cellulaire peut être à l'origine d'une aggravation ou d'une amélioration de l'état parodontal chez la souris. Nous avons également montré que l'utilisation d'immunothérapies chez l'Homme modulant les LB permet une amélioration des critères cliniques ou biologiques des maladies parodontales. De nombreuses études animales avaient montré qu'une déplétion ou une délétion fonctionnelle des LB pouvait améliorer l'état parodontal des patients, notamment une diminution de la perte osseuse [35, 36, 37, 449]. Seul Klausen et al. en 1989 [12] montrèrent une augmentation de la perte osseuse suite à une déficience temporelle et partielle en LB chez la souris, touchant probablement les LB2 au niveau des OLS.

Nos résultats et les études sur les LB dans les parodontites ne vont pas dans le sens d'une dichotomie entre LB1 destructeurs et LB2 protecteurs : l'organisation de la réponse immunitaire mêle à la fois des aspects protecteurs et destructeurs dans les deux populations. Ce principe, présenté de manière inversée dans l'athérosclérose [521, 523], avait pourtant déjà été suggéré par certains auteurs avec les LB1a (CD5<sup>+</sup>) pour les parodontites [33]. Il faut cependant distinguer au sein des différents LB CD5<sup>+</sup>, notamment LB1, des LB effecteurs, pouvant effectivement participer aux destructions tissulaires, et les LB1 régulateurs au rôle potentiellement protecteur.

Les parodontites sont polymorphes : quelle que soit la classification utilisée, les catégories décrites sont hétérogènes. La classification de Page & Ecke n'est pas exclusive et a le mérite d'être construite uniquement à partir de données objectives qui permettront à l'avenir une meilleure comparaison des résultats cliniques et biologiques dans les maladies parodontales et de mieux définir la notion des profils immunologiques dans les parodontites. Les critères de la classification d'Armitage sont subjectifs et sont adaptés au fur et à mesure des études pour faciliter le positionnement des patients, car certaines situations cliniques sont difficiles à classer [18].

La détermination de profils immunologiques basés sur les proportions de LB mémoires sanguins et de LB1 CD11b<sup>+</sup>, pourrait servir de biomarqueurs des maladies parodontales et permettre de mettre en place une approche thérapeutique personnalisée du patient dans la prise en charge de sa maladie parodontale.

Une utilisation sécurisée et contrôlée d'immunothérapies locales ou générales pourrait aider à la résolution de certaines atteintes parodontales réfractaires aux traitements parodontaux conventionnels, voire les formes sévères.

L'étude de Schmidt et al. 2014 [533] met en avant une différence majeure au niveau du taux de LB mémoires entre parodontite chronique et agressive. L'hypothèse d'une absence de réponse systémique adaptative, ou d'une réponse peu efficace dans les parodontites agressives, contrairement aux parodontites chroniques est compatible avec nos résultats.

Le modèle suivant peut donc être évoqué : face au défi bactérien, la réponse est d'abord locale, sans destruction tissulaire (gingivite). La stimulation répétée et variable du système immunitaire est à l'origine d'une inflammation non résolue et d'une absence de clairance bactérienne ; le développement d'une réponse systémique en réponse à cet échec de résolution locale de l'infection et l'arrivée de LB mémoires, notamment Sw, peut être un facteur déclencheur, mais l'absence, ou la déficience, de cette réponse peut également être à l'origine d'un défaut de régulation permettant le développement des destructions tissulaires liées à la réponse locale. De nombreux facteurs, génétiques et épigénétiques, déterminent les modalités de cette réponse et peuvent participer à la définition de profils immunologiques dans les parodontites. Face à une atteinte parodontale légère et modérée, connaître le profil immunologique du patient, s'il signe un type de réponse LB, pourrait déterminer le pronostic du patient à développer une atteinte plus sévère.

Aucune étude sur des échantillons de gencives n'a montré les différentes sous-populations de LB mémoires au sein de la gencive et des profils immunologiques. Nous savions déjà que les LB CD5<sup>+</sup> étaient augmentés dans les gencives, mais que cet aspect n'était pas toujours présent dans le sang des patients [294, 295, 296, 297]. Les différentes études histologiques mettent en avant des agrégats de LB, de LT et de plasmocytes dans les gencives, en fonction de différents états pathologiques. Cependant, la répartition des différentes sous-populations de LB dans nos échantillons de gencive doit être précisée. Ainsi, nous avons émis une première hypothèse quant à l'organisation des LB dans les gencives saines et pathologiques. L'organisation de ces agrégats cellulaires est dépendante de l'environnement cytokinique. Cette organisation est probablement dépendante des gradients de facteurs de virulence bactériens (FVB), notamment des LPS, fimbriae et gingipaines, et elle varie au grès des évolutions du biofilm. Ces gradients modifient les gradients de cytokine et de chémokines. Les orientations phénotypiques dépendent de ces gradients, ainsi que les

migrations cellulaires. Ce mécanisme peut expliquer les observations histologiques effectuées sur la gencive et les conséquences sur la mise en place des destructions tissulaires.

La présence d'un déplacement de la lymphopoïèse dans les OLS dans le cadre d'une parodontite reste à démontrer, cependant l'augmentation de la population des LB mémoires dans les SP est un indice important de cette adaptation physiologique. La déficience ou l'absence de réponse systémique pourrait être liée à une écotaxie des cellules présentatrices de l'antigène vers les OLS perturbée. Ainsi si le drainage lymphatique ou les migrations cellulaires sont perturbés au sein des gencives, pour diverses raisons (génétiques ou épigénétiques), les réactions locales se développent et la réponse systémique ne peut se développer correctement.

L'organisation de la réponse locale face au défi bactérien à travers une lymphangiogénèse locale, voire une lymphogénèse locale et sa modulation par une réponse systémique semblent donc être un point essentiel dans l'évolution d'une atteinte parodontale et son pronostic. L'absence de résolution de l'inflammation est un facteur essentiel à la mise en place d'un OLT [233] qui pourrait être à la fois un élément protecteur ou destructeur en fonction du profil immunologique du patient. Nous avons donc émis une seconde hypothèse sur la présence d'OLT dans les parodontites, ou dans certaines formes de parodontites. L'axe RANKL-RANK-OPG a un rôle essentiel dans la croissance des organes lymphoïdes et sa production par les LB activés aurait un rôle dans la croissance du tissu lymphoïde tertiaire et la régulation de la réponse immunitaire locale.

RANKL est un point essentiel dans l'ostéoimmunologie, aussi bien dans les conditions physiologiques que pathologiques. Nous émettons ainsi une dernière hypothèse, à partir de l'analyse de la littérature, concernant son rôle dans les gencives saines : une dérégulation de ce mécanisme pourrait expliquer la perte osseuse et sa rapidité en présence et en absence d'une réponse systémique. Ces différents éléments nous amènent donc à proposer un modèle pour la réponse immunitaire B dans les parodontites.

Chaque point se doit d'être vérifié dans de futures recherches pour valider ou infirmer nos suppositions et faire évoluer notre modèle concernant le rôle du LB dans les maladies parodontales. L'évolution de la réponse en fonction du profil immunologique sanguin du patient est également un point essentiel à explorer par la suite. Cette meilleure connaissance du rôle des différentes sous-populations de LB aidera à la réalisation d'un diagnostic parodontal précis et à déterminer de nouvelles voies thérapeutiques chez certains patients.

## I Hypothèse 1 : Les différentes sous-populations des lymphocytes B dans la gencive

Peu d'études ont présenté les différentes populations des LB dans les gencives saines [156, 179, 224] et leur organisation. Ils sont présentés comme peu nombreux dans la gencive saine, sans distinguer les différentes sous-populations qui les composent. Dans les tissus parodontaux, la prédominance de plasmocytes est décrite depuis longtemps, mais les sous-populations de LB ne sont pas encore rapportées chez l'Homme.

Récemment, les populations lymphocytaires ont été présentées comme formant des agrégats cellulaires, plus ou moins distincts dans les gencives [179]. Cette organisation en zones distinctes peut s'expliquer par la présence de gradients de FVB, issus du biofilm dysbiotique, et de gradients de cytokines et de chémokines en réponse à ces gradients de productions bactériennes. Ainsi l'environnement cytokinique ne serait pas homogène dans les tissus parodontaux et différents types de réponses T se mettent en place en fonction de la combinaison de ces différents gradients et des types cellulaires présents.

Les études sur les tissus parodontaux montrent une prédominance des plasmocytes, des LB mémoires et une forte proportion de LB CD5<sup>+</sup> [32, 156, 179, 190, 294, 295, 296, 297]. Les plasmocytes ne sont pas juste des cellules sécrétrices d'Ac, mais également des producteurs de cytokines pro et anti-inflammatoires et de sRANKL [156]. Leur organisation au sein des tissus parodontaux n'a jamais été discutée, mais elle pourrait être liée à leur origine, et leurs sécrétions et leur rôle pourraient varier en fonction de leur localisation.

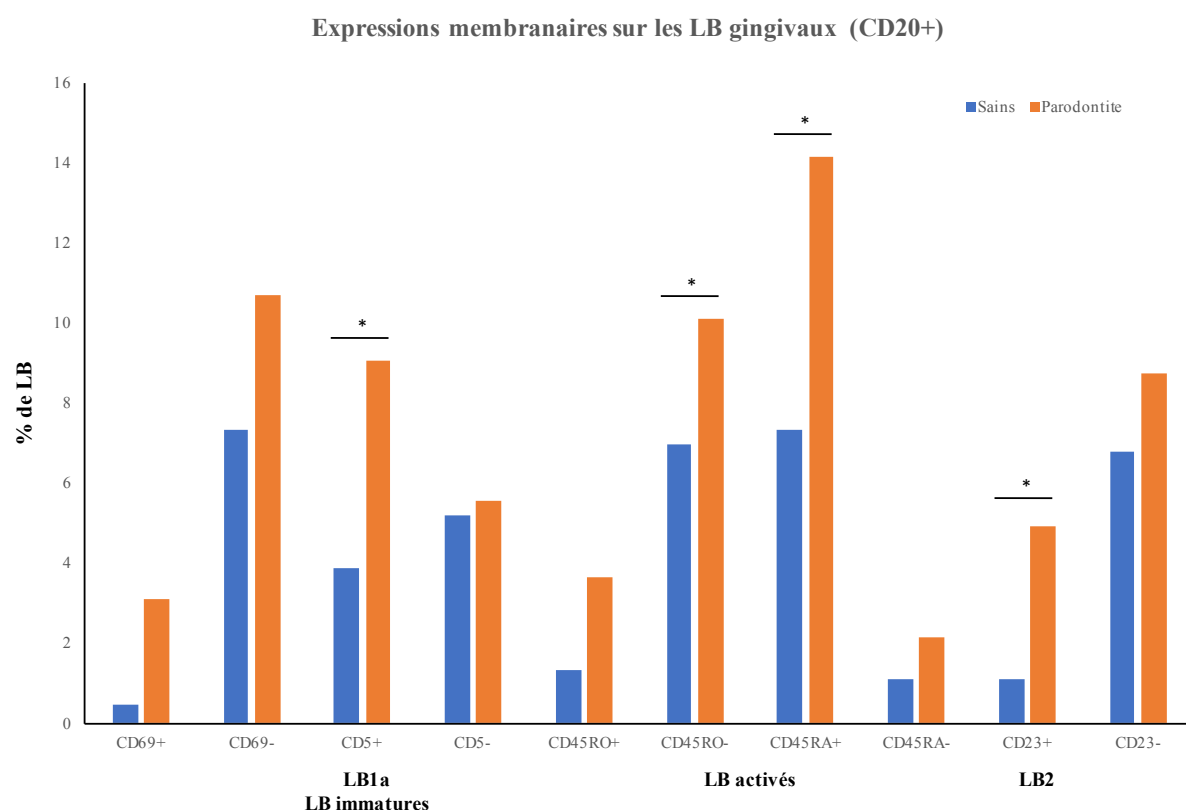
Par ailleurs, depuis les travaux de Griffin et Rothstein en 2011, les LB CD5<sup>+</sup> ne sont plus chez l'Homme défini comme des LB1a, cellules autoréactives, mais aussi comme des populations immatures de LB, parfois avec des fonctions régulatrices [276, 314, 323, 324, 347]. Ainsi, l'interprétation des études portant sur les LB CD5<sup>+</sup> et leur rôle dans les gencives doivent être revus avec un nouveau regard [314]. Les LB1 ont un rôle certain dans la mise en place des parodontites, mais seule la population LB1 CD5<sup>+</sup> a été discutée, sans tenir compte de LB1 CD5<sup>-</sup> chez l'Homme.

### 1- Les LB dans les gencives : la description histologique dans la littérature doit être précisée

Dans les gencives saines, une population minimale de LB est décrite, par rapport aux LT [224]. Cette population est majoritairement CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> et est attribuée à un phénotype mémoire dans la gencive saine [156], or rien ne permet de distinguer au sein de cette

population, les LB1 ( $CD20^+CD27^+CD43^+$ ), LB mémoires ( $CD20^+CD27^+CD43^-CD23^+$ ), et des LB-ZM-like ( $CD20^+CD27^+CD43^-CD23^-$ ), et leurs proportions [334]. Les LB1 ont été décrits chez la souris comme étant  $CD23^-$ , donc proches du phénotype de LB-ZM-like [314]. Il faudrait pouvoir les distinguer en cytométrie en flux, mais également en immunohistochimie pour visualiser leur répartition dans la gencive, mais également leur niveau d'activation et leurs sous-populations. Nos échantillons de gencive, bien que peu nombreux, ont montré des populations mémoires hétérogènes, sans que nous puissions distinguer précisément les LB1 ( $CD43^+$ ,  $CD23^-$ ), des LB mémoires et ZM-Like ( $CD43^-$ ,  $CD23^{+/-}$ ), ni les sous-populations de LB1 ( $CD11b^{+/-}$ ).

Afar et al. en 1992 mirent en évidence une population de LB  $CD20^+$  majoritairement  $CD23^-$  augmentait de manière significative dans les parodontites, tout en restant minoritaire [294] (Figure 11). Cela peut souligner que les LB présents dans la gencive saine ont un phénotype LB1 ou LB-ZM-like et non préférentiellement mémoire, et que les parodontites sont caractérisées par l'augmentation dans les tissus de LB mémoires, soit par des proliférations locales soit par migrations des LB des OLS vers les tissus parodontaux.



**Figure 11 : Évolution des différentes sous-populations dans les gencives – graphique reconstruit d'après les résultats de Afar et al. 1992 – [294]. \* : différence significative**

Dans les gingivites, les proportions de LB (LB et plasmocytes) et de LT augmentent, mais il n'apparaît pas de zones riches en plasmocytes comme dans les parodontites [179, 300]. Il est probable que dans cette situation la réaction locale soit responsable de ces activations cellulaires et qu'une réaction systémique soit minime, voire indétectable. Dans les parodontites, les populations plasmocytaires sont majoritaires et sont la source à la fois de la sécrétion d'Ac contre les bactéries parodontopathogènes (IgG surtout), mais également des Ac naturels (nIgG, nIgM, nIgA) issus de transformation plasmocytaire des LB1 et des LB-ZM-like [332]. L'origine de ces plasmocytes reste donc un point à préciser : ils peuvent être issus d'une activation locale des LB gingivaux résidents, initialement décrits dans la gencive saine ou issues de LB migrants dans la gencive. Les LB1 et les LB mémoires peuvent être recrutés dans les tissus périphériques.

Au sein de la population CD20<sup>+</sup> dans les parodontites, une population CD5<sup>+</sup> se distingue et est attribuée à des LB1a [179]. Elle est augmentée dans les parodontites, et représenterait de l'ordre de 30% des LB, pour certains auteurs [295, 296, 297]. Cette population et la présence de plasmocytes sont deux caractéristiques essentielles des populations de LB dans les lésions parodontales [332]. Cependant, ces LB CD5<sup>+</sup> ne sont pas que des LB1 [334] et une proportion non négligeable, mais non déterminée est probablement constituée par des LB immatures (T2, T3), dont une bonne partie a des fonctions régulatrices (LB10). Leur répartition est également à préciser.

Enfin, une population naïve (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) est décrite au sein de la gencive saine et dans les gingivites et parodontite [156]. Son rôle et ses caractéristiques dans les gencives restent à définir. Ces LB sécrètent de l'IL-10, suite à des signaux perçus par les TLR et non par le BCR, et ont donc un rôle dans la régulation [554, 555], mais ils semblent être également d'important sécréteurs d'OPG [547]. La plupart des LB dans les tissus non lymphoïdes seraient des cellules naïves qui recirculent constamment entre le sang et la lymphe, via les LN [359]. Cette migration dépendrait des gradients de S1P entre les tissus périphériques et les LN [78, 359]. Leur proportion reste cependant inchangée dans les tissus parodontaux par rapport aux gencives saines.

Le rôle et la localisation de ces différentes populations de LB sont des voies de recherche à explorer dans les tissus parodontaux. Nous émettons cependant une hypothèse quant à l'origine et les orientations des plasmocytes dans les tissus parodontaux.



## **2- L'organisation des cellules immunitaires dans les tissus parodontaux : ZPP et ZPS**

Toutes les cellules immunitaires interagissent entre elles pour permettre l'organisation de la réponse immunitaire. Les réponses innées et adaptatives sont pleinement intriquées, s'orientent et se régulent mutuellement.

Dans les gencives, les plasmocytes s'organisent en agrégat en regard du front de la lésion parodontale, séparés d'une zone T située sous la lamina propria, par une zone de LB non différenciés en plasmocytes [179] : nous l'appellerons zone plasmocytaire primaire (ZPP). Les LB étaient déjà dans cette zone dans les biopsies gingivales de gingivite et de gencive saine, et sont probablement les sources de ces plasmocytes. D'autres agrégats ou zones plasmocytaires sont décrits plus en profondeur dans le conjonctif, sans être en rapport avec des zones riches en LT : nous l'appellerons zone plasmocytaire secondaire (ZPS). L'origine de ces agrégats de LB n'est pas élucidée, mais il serait intéressant de regarder si les plasmocytes de ces deux zones sont différents et de situer leur co-localisation avec les éléments lymphatiques et vasculaires développés dans le parodonte, en réponse au défi bactérien.

Les gradients de cytokines/chémokines/FVB pourraient être en partie responsables de cette organisation cellulaire et tissulaire au sein des tissus parodontaux (Figure 12). Au-delà des ZPP et ZPS, se distingueraient ainsi d'autres zones :

- une zone sulculaire envahie par des PN et quelques LT. Le GCF contient de nombreuses IgA et des cytokines qui vont servir de nutriments pour les bactéries du biofilm. Les PN sont débordés et seront parmi les premiers à être modulés par les FVB
- une zone épithéliale constituée de DCs, d'ILCs (NK, et LT $\gamma\delta$ ), de Th22. Ils vont être les premiers en contact avec le biofilm, et leurs réactions vont participer à l'élaboration de l'environnement cytokinique et aux destructions tissulaires, notamment la formation de la poche parodontale.
- une zone LT, sous la lamina propria. Elle est constituée de l'activation de LT mémoires résidents et les LT CD4<sup>+</sup> activés sont principalement Th1 et Th17. Les LTregs sont absents, car inhibés par l'IL-6 qui est produite par les cellules épithéliales et par l'inhibition de l'IL-2 par *Pg*.
- une zone LB, en regard de la zone LT. Elle est constituée de LB1, LB-ZM-like et de LB mémoires. Les LB de cette zone activent les LT mémoires de la zone LT,

voire quelques LT naïfs qui vont avoir une orientation Th1 et Th17 vu la constitution de l'environnement cytokinique local.

- une ZPP, constituée de plasmocytes issus principalement des LB résidents. Une réponse Th2 pourrait cependant avoir lieu, car les FVB seraient moins présents.

- une ZPS, autour des HEVs, où l'environnement cytokinique serait plus favorable à une réponse LTh2 et LTreg, et l'influence des FVB moins présente.

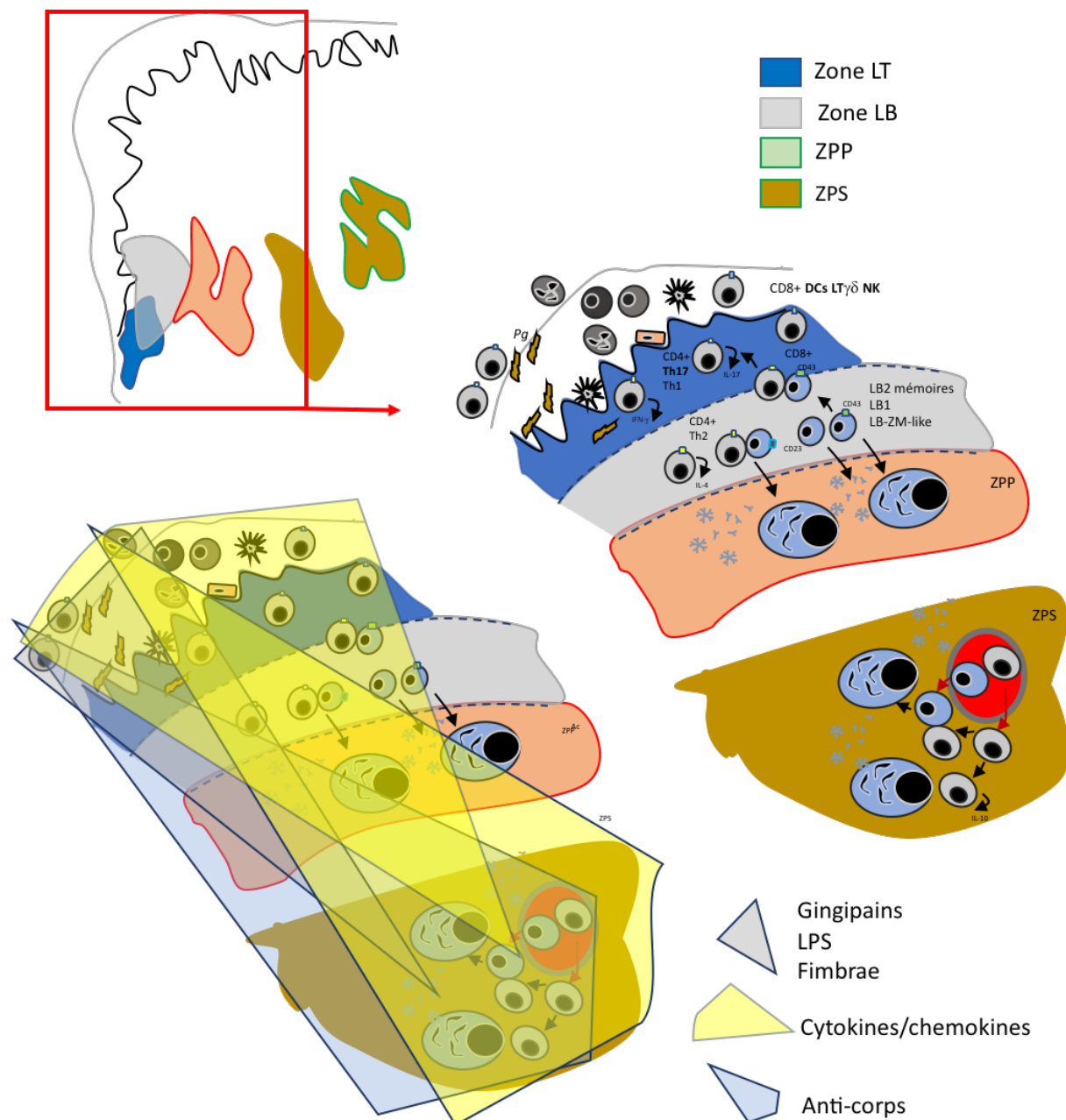
### **a- Réponse innée majoritaire dans les ZPP**

Les plasmocytes des ZPP sont probablement issus de l'activation locale des LB résidents et sont probablement hétérogènes. Les LPS bactériens activent ces LB résidents au repos et l'évolution va différer en fonction de leurs caractéristiques et de leurs origines :

- Les LB1 vont être activés par les signaux perçus par les TLR et être à la fois activateurs d'éventuels LT naïfs locaux. Ils vont se différencier en plasmocytes sécréteurs de nIgM ou de nIgG et sont caractéristiques d'une réaction innée dépendante des LB. Ils vont également activer les LT naïfs et mémoires.

- Les LB-ZM-like vont réagir de manière similaire au LB1, mais éventuellement de manière plus spécifique à certains Ag. Ils vont également participer à la constitution de la ZPP.

- Les LB mémoires résidents. Ils sont spécifiques d'un Ag et une nouvelle rencontre avec l'Ag va être à l'origine d'une réactivation de ces LB. Ils vont alors proliférer sur place pour une partie et reconstituer une population mémoire locale, d'autres vont activer les LT mémoires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> apparentés au même Ag, et enfin d'autres pourraient recirculer vers les OLS.



**Figure 12 : Organisation des cellules immunitaires dans la gencive : ZPP, ZPS et gradients**

Ainsi, la ZPP serait issue d'une réponse majoritairement innée. Elle permet une réponse rapide au défi bactérien, le temps que la réponse adaptative s'organise. Les réactions auto-immunes sont importantes dans cette zone, mais elles sont principalement liées à l'élimination des fragments des collagènes et des cellules mortes (signaux de dangers) et sont principalement physiologiques.

L'action subversive du *Pg* va participer à l'élaboration d'un environnement cytokinique pro-inflammatoire. La régulation est inhibée, car l'environnement cytokinique n'est pas favorable à l'induction de LTreg ou de LBreg. De plus, dans cette zone, une

conversion des LTreg en LTh17 est également possible [556]. Enfin, une migration de LB1 CD11b<sup>+</sup> est possible, mais cette population semble être déficitaire dans les parodontites, ce qui peut participer au déficit de régulation dans cette zone.

Les DCs gingivaux s'activent, mûrissent, présentent l'Ag et rejoignent les vaisseaux lymphatiques. Ils migrent vers les OLS, pour amorcer une réponse adaptative qui va aboutir à la formation des ZPS.

### **b- Réponse adaptative majoritaire dans les ZPS**

La ZPS est probablement composée principalement de plasmocytes issus des LB mémoires Sw et USw ou de plasmablastes circulants, issus des OLS, en réponse au défi bactérien. Il y a probablement quelques LB1 et LB-ZM-like résidents dans cette zone. La formation des ZPS est probablement en relation avec la néovascularisation et la formation des HEVs dans les parodontites [557].

Dès leur arrivée dans les tissus, les LB et les plasmocytes secrètent des Ac spécifiques des Ag. Les LT apparentés ont également été activés, migrent dans les tissus et participent à l'induction de la différenciation plasmocytaire. Ils doivent être principalement Th2 et LTregs et induisent un phénotype protecteur dans les parodontites. La régulation est donc induite dans les ZPS et doit participer à la limitation de l'extension des ZPP dans les tissus.

Ils participent à l'environnement cytokinique et au développement de la régulation dans les zones profondes, mais l'action subversive de Pg ne permet pas d'avoir une régulation suffisante dans les ZPP, ni une résolution de l'inflammation.

Il est probable également que les LT et les LB activés, issus de la réponse OLS entrent dans les ZPP et limitent ou participent à leur expansion en fonction de leur orientation phénotypique. Le biofilm dysbiotique entretient un environnement inflammatoire local important. La mise en place d'une réponse LB systémique a un rôle protecteur, et éventuellement d'organisation de la réponse locale, mais l'action subversive du biofilm dysbiotique pourrait déréguler ce mécanisme et amener à l'induction de la perte osseuse. La désorganisation du biofilm par des moyens mécaniques durant les traitements parodontaux réduit l'action subversive du biofilm dysbiotique. La réponse systémique devient efficace et protectrice ; l'inflammation se résout et les mécanismes cicatriciels se mettent en place.

Dans certaines formes de parodontites, les ZPS pourraient être absentes, incapables de produire suffisamment d'Ac spécifiques aux Ag, responsables de la production d'auto-anticorps par les LB, ou caractérisés par une régulation altérée, ne permettant pas à la fois la clairance bactérienne et la limitation de l'expansion de la ZPP. La production d'Ac serait

effectuée principalement dans les ZPP. Une concentration sérique d'Ig ne serait pas obligatoirement moins importante dans ces types de parodontite, mais les types d'Ig seraient différents [542]. De même, une régulation importante dans les ZPS pourrait être aussi pathologique, car elle limiterait la clairance bactérienne et permettrait également à *Pg* d'échapper au système immunitaire.

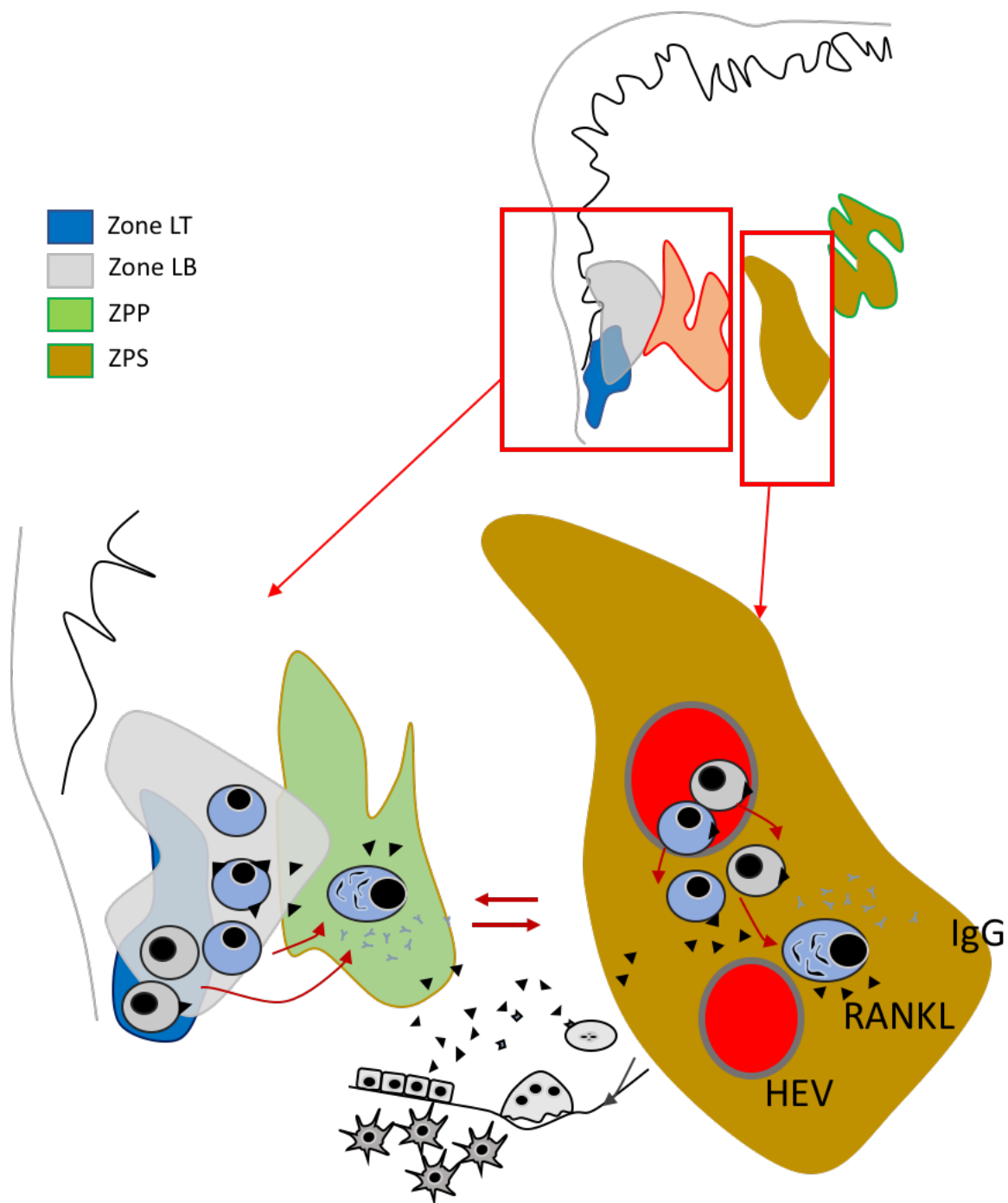
Ainsi la réponse systémique pourrait être responsable de l'initiation d'une parodontite, mais sa déficience, quand les conditions locales ou certains facteurs génétiques favorisent une hyper réponse également responsable de l'induction des destructions tissulaires.

Ces mécanismes et leur association avec différents profils immunitaires dans les parodontites restent à démontrer. Si cette hypothèse est vraie, une connaissance du profil immunologique sanguin des patients permettrait d'instaurer différentes stratégies thérapeutiques au niveau du système immunitaire, pour rééquilibrer les interactions entre ZPP et ZPS.

### 3- Les LB CD5<sup>+</sup> dans le sang et les gencives : Qui sont-ils ?

L'autre caractéristique des parodontites sévères présentées dans les années 1990 était l'augmentation des LB CD5<sup>+</sup>, souvent attribués aux LB1a, et aux mécanismes auto-immuns [294-297, 332, 558]. Nous ne l'avons pas constaté chez nos patients, excepté chez le patient 4.

Depuis les travaux de Griffin et Rothstein en 2011 [314, 324], nous savons que les caractéristiques des LB1 humains ne reposent pas sur l'expression de CD5<sup>+</sup>. Comme cela avait été suggéré auparavant, d'autres LB que les LB1 sont concernés par une expression de CD5<sup>+</sup>, notamment, les LB régulateurs, les LB transitionnels (T1, T2) et les LB pré-naïfs (T3) [276, 558]. Ce sont des LB immatures qui pour la plupart ont des fonctions régulatrices, notamment via la sécrétion d'IL-10. Cependant, l'expression de CD5 a longtemps été considérée comme un marqueur d'activation du LB humain, avant d'être attribuée à un type particulier de LB [559]. Il est probable que l'expression de CD5 sur les LB puisse être pour certaines populations "innée" et pour d'autres "acquise" suite à une activation. Les deux populations coexisteraient au sein d'un même individu [560]. De même, l'expression de CD5 peut être perdue, également dans un contexte de maturation tissulaire.



**Figure 13 : Induction de l'ostéoclastogénèse par les ZPP et les ZPS**

Le rôle des LB  $CD5^+$  comme indicateur d'auto-immunité est même discuté depuis pour des pathologies telles que le SLE où il était présenté comme augmenté [560, 561]. Comme l'expression de  $CD5$  concerne les LB régulateurs également, les LB  $CD5^+$  jouent un rôle paradoxal, aussi bien dans la prévention que l'induction de l'auto-immunité [560].

L'augmentation des LB CD5<sup>+</sup> dans le SLE pourrait plus correspondre à une régulation défectueuse de la fonction même du CD5 sur les LB, notamment dans l'induction de l'apoptose [560]. Dans la LLC (leucémie lymphoïde chronique), tous les LB sont CD5<sup>+</sup> et cela semble être une caractéristique de leur dysfonction, et notamment de leur survie [562].

Récemment la proportion de LB CD5<sup>+</sup> sanguins a été montrée comme significativement plus basse chez les patients souffrants d'un SLE actif que chez les témoins sains, et que ce mécanisme pourrait être important [561]. L'augmentation des LB CD5<sup>+</sup> rapportée dans la littérature et chez notre patient 4 pourrait ainsi ne pas refléter une activité auto-immune au sein des gencives, mais être une particularité de ce patient, à l'origine d'une dysfonction constitutive ou acquise d'une partie des LB, qui pourrait être responsable d'une réponse immunitaire particulière.

#### **4- Les LB1 dans le sang et les gencives**

Chez l'homme, les LB1 sont distingués en LB1 CD11b<sup>-</sup> (sécréteurs d'nIgM) et LB1 CD11b<sup>+</sup> (orchestrateurs) [331]. Ces deux populations peuvent être CD5<sup>+</sup> ou CD5<sup>-</sup>. Seul un quart des LB1 CD11b<sup>+</sup> sont CD5<sup>+</sup>, alors que les LB1 CD11b<sup>-</sup> sont par contre majoritairement CD5<sup>+</sup> [331]. L'expression de CD11b, une intégrine, procure d'importantes capacités de migration [332, 333]. Le CD11b serait donc une distinction entre les LB1 résidents et les LB1 circulants et migrants au gré des signaux chimiotactiques, avant qu'ils ne s'établissent dans des tissus cibles. Il est possible qu'un LB1 CD5<sup>-</sup> devienne CD5<sup>+</sup> et inversement, suite à une activation sous l'action de différents signaux [518, 560]. Par contre, il ne semble pas possible que des LB1 CD11b<sup>+</sup> deviennent CD11b<sup>-</sup> [320].

##### **a- Les LB1 CD11b<sup>+</sup> circulants**

Les LB1 CD11b<sup>+</sup> circulent de manière homéostatique entre les tissus inflammés et le péritoine [314, 324, 336, 563]. Dans des conditions inflammatoires, les LB1 quittent rapidement le péritoine et se déplacent vers la rate et l'intestin grêle [321, 564], mais également vers le site de l'inflammation. Les LB1 semblent avoir une plus forte propension à entrer dans les tissus inflammatoires que les LB mémoires, en suivant des signaux de homing spécifiques [336].

La réponse aux signaux chimiotactiques (CXCR4/ CXCL12) est plus faible pour les LB1 que les autres LB et n'est pas le mécanisme principal du recrutement des LB1. Les LB1 requièrent une diminution de l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  pour leur homing vers les sites

inflammatoires et leur sortie du péritoine. De plus, un maintien de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  est nécessaire à leur pénétration dans les tissus (liaison à V-CAM-I, généralement augmenté au niveau de l'endothélium vasculaire dans les tissus inflammatoires [336]). Cependant, les LB1 sont capables de répondre aux signaux de homing CXCL13/CXCR5, et une augmentation des CXCL13 a été mise en avant dans les tissus parodontaux [281, 563]. CD11b doit également avoir un rôle dans la pénétration dans les tissus des LB1 CD11b<sup>+</sup> car il forme avec CD18 l'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  qui a pour ligand I-CAM-1 et 2.

Ces mécanismes ont été décrits au niveau de la peau [336], mais il est probable que des mécanismes similaires se produisent dans les gencives. La diminution des LB1 CD11b<sup>+</sup> que nous avons observée dans le sang de nos patients SP est donc probablement due à déséquilibre entre l'importance du recrutement des LB1 CD11b<sup>+</sup> et son autorenouvellement ou sa sortie des tissus péritonéaux. Il est donc nécessaire de déterminer quel mécanisme est en cause dans les parodontites pour expliquer la diminution des LB1 CD11b<sup>+</sup> dans le sang des patients SP. La mutation d'intégrines [471] ou un polymorphisme des I-CAM [470] peut favoriser une atteinte parodontale. Cela sous-entend donc que la migration des LB1 CD11b<sup>+</sup> a un rôle probablement important dans la régulation au sein des tissus parodontaux et que son manque est délétère.

Les taux de-LB CD11b<sup>+</sup> étaient généralement plus bas dans les SP que chez les témoins, mais pas pour tous les patients. Les LB CD11b<sup>+</sup> circulants apparaissent comme augmentés dans des pathologies auto-immunes comme la SLE [314]. Un déséquilibre de la présence de LB1 CD11b<sup>+</sup> (en plus ou en moins) et leur dysfonction pourrait-il favoriser une parodontite ?

### **b- Les LB1 CD11b<sup>+</sup> dans les gencives**

La gencive cliniquement saine est toujours en contact avec un biofilm ; le système doit être relativement dynamique avec des circulations constantes de LB1 CD11b<sup>+</sup> entre le péritoine et la gencive, afin de maintenir l'homéostasie.

Ils sont responsables d'une sécrétion spontanée d'IL-10 ce qui évite toute activation non contrôlée au sein de la gencive. Cette sécrétion peut être augmentée : l'IL-10 peut réguler de manière autocrine sa propre synthèse par les LB1 CD11b<sup>+</sup> en modulant l'expression des TLR à la surface, et la prolifération cellulaire. Cela permet de réduire, au même titre que la régulation du signal BCR, l'activation des LB autoréactifs via la stimulation TLR [565, 566].



L'IL-10 va ainsi réduire la présentation d'Ag et la production de cytokines pro-inflammatoires et la prolifération des LT.

Il est possible que les LB1 CD11b<sup>+</sup> changent de phénotype et de fonction au sein des tissus parodontaux, selon les conditions inflammatoires, notamment l'action des cytokines. L'IL-10 est une cytokine régulatrice clé qui inhibe la production des cytokines inflammatoires. Elle partage dans sa voie de signalisation STAT3 avec l'IL-6 : ce facteur de transcription est donc bimodal et peut avoir donc des effets pro et anti-inflammatoires. Il y aurait donc des effets antagonistes entre IL-6 et IL-10. Un excès d'IL-10 peut également participer au maintien d'une infection chronique en limitant la clairance bactérienne [465]. L'IL-10 est augmentée dans les parodontites, et croît de nouveau après traitement parodontal [567, 568].

Les LPS-Pg peuvent agir sur les TLR4, probablement en interaction croisée avec le TLR2, et induire une production d'IL-1 $\beta$  et une résorption osseuse [134]. Par contre, l'action de FimA-Pg sur les TLR2/1 des LT et des cellules CD11b<sup>+</sup> est responsable de l'induction de la production d'IL-10 [466]. La production d'IL-10 est alors à l'origine d'une augmentation de PD1 et de PDL1, sur les LT et des cellules CD11b<sup>+</sup>, respectivement, et aboutit à la régulation de la réponse T. Les cellules CD11b<sup>+</sup> sont considérées comme des Mo ou des DCs, mais il est possible que les LB1 CD11b<sup>+</sup> soient également concernées et que comme nous l'avons évoqué précédemment les gradients de FVB et les types de FVB modifient les orientations cellulaires.

De même, des interactions croisées entre IL-1, les LPS-Pg sur TLR2 ou 4, et RANKL régulant l'orientation des précurseurs ostéoclastiques vers la voie ostéoclastique ou la libération de cytokines pro-inflammatoires ont été décrites [23, 124, 136, 189]. Ces mécanismes pourraient également concerner les LB1 CD11b<sup>+</sup> qui seraient également sensibles à l'environnement cytokinique.

Enfin, l'IL-10 favorise l'expansion et l'expression de CD5, qui apparaîtrait alors comme un facteur d'activation pour les LB1 CD11b<sup>+</sup>, et qui permettrait d'amplifier la production d'IL-10 et la sécrétion d'IgM et d'IgG naturelles [569, 570-572].

L'IL-6 est un facteur qui peut être responsable d'une diminution du CD5 membranaire [518]. Deux isoformes de CD5 sont décrites sur les lymphocytes humains, le CD5-E1A et CD5-E1B, issus d'un épissage alternatif du gène de CD5 [310, 572, 573], et l'IL-6 favorise l'expression du CD5-E1B, caractéristique d'une absence de CD5 à la membrane, et signant éventuellement une forme de maturation. Le taux d'IL-6 dans les tissus pourrait orienter les

fonctions de cette sous-population de LB1 vers un phénotype CD5<sup>-</sup> encore plus majoritaire, qui a la possibilité ensuite de se différencier en LB1-CDP puis ostéoclaste-like, limitant ainsi la régulation par les LB1 CD11b<sup>+</sup> au sein des tissus parodontaux, mais augmentant l'ostéoclastogénèse [275, 327, 328], et l'activation des LT, puis des LB. Une augmentation de l'IL-6 est observée dans les parodontites [452, 507, 518, 567] ; sa diffusion au niveau systémique pourrait être à l'origine d'une diminution des LB1 CD11b<sup>+</sup> sanguins en bloquant leur renouvellement au niveau du péritoine ou des OLS. Dans le péritoine, chez la souris, LB1 CD11b<sup>+</sup> et LB1 CD11b<sup>-</sup> sont tous les deux principalement CD5<sup>+</sup> (marqueurs d'immaturité) [574] et les CD11b<sup>-</sup> seraient les précurseurs des CD11b<sup>+</sup>. Limiter l'expression de CD5 au niveau du péritoine pourrait être une cause de la diminution des LB1 CD11b<sup>+</sup> sanguins observés dans notre étude sur le sang de patients SP.

Ainsi, l'utilisation d'un anti-IL6R pourrait favoriser l'expression de CD5 sur les LB1 CD11b<sup>+</sup> et normaliser le taux de LB1 CD11b<sup>+</sup>. Cependant, d'autres cytokines agissent également sur l'expression de CD5. Il s'agit notamment de l'IL-5, l'IL-4, l'IL-2 et l'IL-12. L'IL-4 régule à la baisse CD5 et augmente l'expression de CD72, et l'IL-2 et notamment l'IL-5, chez la souris, induit une prolifération des LB CD5<sup>+</sup> et la production d'auto-anticorps et l'IL-12, une Th1 cytokine, inhibe le développement des LB1 [558, 575]. L'action subversive de Pg, notamment la réduction de l'IL-12 par les gingipaines, bloque l'inhibition des LB1 et favorise ainsi leur expansion.

Une des principales critiques faites à Griffin et al. en 2011, lors de la présentation des phénotypes humains des LB1 était de savoir si il n'y avait pas confusion des LB1 CD11b<sup>+</sup> avec des monocytes et les LB1 CD11b<sup>-</sup> avec des LT CD8<sup>+</sup> [576, 577]. La question pourrait également s'inverser : est ce que les Mo-like décrits dans la gencive, comme des dérivés des DCs ne seraient pas des LB1 CD11b<sup>+</sup> [274] ?

Les LB1 sont à cheval entre les lignées myéloïdes et lymphoïdes dans leurs propriétés. L'expression de CD11b concerne aussi d'autres types cellulaires, notamment des Mo-like qui ont été décrits chez la souris comme étant des cellules ressemblant aux DCs, par l'expression du CMH-II [192, 578]. Ces Mo-like sont CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CMH-II<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> et se situent dans le conjonctif et activent les LT. L'expression de CD11b est commune avec CD11c sur les LB1 CD11b<sup>+</sup> [334], et active notamment les LT. Cela pourrait être la même population qui a aussi des capacités de phagocytose (LB1-CDP) et qui exprime alors RANK et a la capacité de se différencier en ostéoclaste-like [275] sous l'action de RANKL.

Ainsi, le rôle des LB1 CD11b<sup>+</sup> circulants serait à la fois protecteur (capacités de régulations spontanées) et destructeur (activateurs LT puissants, différenciation en ostéoclaste-like) en fonction de l'environnement cytokinique et notamment d'une balance entre IL-6 et IL-10. Dans les ZPP, la régulation est inhibée et la balance IL-6/IL-10 doit être en défaveur de l'IL-10. Les LB1 CD11b<sup>+</sup> s'orientent vers une différenciation en LB1-CDP puis en ostéoclaste-like en présence de sRANKL qui peut être apporté par la formation de la ZPS et l'arrivée des LB mémoires Sw RANKL<sup>++</sup>. Dans les ZPS, les deux orientations doivent être possibles en fonction de la balance IL-6/IL-10.

L'augmentation des LB1 CD11b<sup>+</sup> pourrait être également associée à une augmentation de la régulation dans les parodontites et à la mise en place des processus de cicatrisation dans les tissus parodontaux, suite à l'élimination du biofilm. Les LB1 semblent avoir un rôle dans ces processus, notamment à travers la sécrétion d'IL-10 [579].

Un quart des LB1 CD11b<sup>+</sup> est décrit comme étant CD5<sup>+</sup> [331]. Dans les gencives saines, ils pourraient correspondre à des formes quiescentes, en anergie ; les cellules anergiques expriment des niveaux significatifs de CD5, inférieurs à ceux exprimés sur les LB1 [580]. Ainsi un faible niveau d'induction de CD5 sur les LB par une stimulation par un auto-Ag peut être suffisant pour induire un état anergique dans les LB autoréactifs et ainsi limiter la production d'auto-Ac [566]. Ils rejoignent une sorte de population B1 « mémoire », capable de réagir rapidement, de manière innée à la présence de signaux de danger, qui est principalement constituée de LB1 CD11b<sup>-</sup>.

### **c- Les LB1 CD11b<sup>-</sup> dans les gencives**

Les LB1a (LB CD5<sup>+</sup>) mis en évidence dans les gencives correspondraient majoritairement au phénotype de LB1 CD11b<sup>-</sup>. Leur activation aboutirait à leur prolifération et à leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgM, notamment anti-collagène.

Dans la gencive saine, ils seraient principalement quiescents, en anergie [294]. Par analogie avec la peau, les cellules CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> décrites dans la gencive saine sont probablement minoritaires [336]. Elles sont majoritairement des LB mémoires quiescents et résidents, mais une partie est constituée de LB1 CD11b<sup>-</sup> et de quelques LB1 CD11b<sup>+</sup>. Les LB1 CD11b<sup>-</sup> représentent probablement une part importante des cellules CD20<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> décrites dans la gencive saine [294] et les parodontites [179, 294].

Dans des conditions inflammatoires, des signaux de CD40 ou des hautes doses de ligands des TLR peuvent surmonter l'état anergique des LB1 et permettre leur activation pendant l'infection [566]. Les LB CD11b<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup> activés seront moins sensibles à l'apoptose induite par les IgM, et ce mécanisme peut faciliter leur prolifération, tout en induisant une apoptose des LB CD11b<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup> non activés [581]. Ainsi, une sélection des clones de LB1 répondants aux facteurs d'activation peut être réalisée par ce mécanisme. L'expression de CD5 rend, par ailleurs, le LB plus sensible à l'apoptose induite par l'IgM que les LB CD5<sup>-</sup> [558, 581, 582] et ce mécanisme doit toucher également les LB1 CD11b<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>. Ils étaient diminués dans le sang des SP (p=0, 0044), dans notre étude. Comme pour les LB1 CD11b<sup>+</sup>, la perte de l'expression de CD5 membranaire pourrait permettre une différenciation en LB1-CDP, puis en ostéoclastes-like.

Les fonctions des LB1 dans les gencives sont multiples. Elles font partie de la première ligne de défense face à un pathogène au niveau gingival, mais aussi ont un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie. Les LB1 CD5<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> sont principalement, responsables de la sécrétion d'Ac naturels, après leur différenciation en plasmocytes. Cependant, l'interaction entre CD5 et CD72 joue un rôle majeur dans l'homéostasie des LB et des LT régulateurs : les LB10 (CD5<sup>+</sup>CD11b<sup>hi</sup>IL-10<sup>+</sup>) induisent l'expansion des CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> LTregs (iTregs) et leur expansion est induite par les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> LTregs (Tr-1). Le blocage de CD5 ou CD72 réduit la présence de LB10 ou des iTregs dans les cultures cellulaires [240]. Le ligand naturel du CD5 est le CD72, et il est également exprimé par le LB, notamment les LB CD5<sup>+</sup> [558, 575], mais il pourrait être aussi un récepteur à l'IL-1 [583].

Ainsi les LB1 CD5<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> sont une source de LB10 suite à une induction.

#### **d- Les LB10 ; en partie issus des LB1**

Une part des LB CD5<sup>+</sup> constituent une partie des LB10, qui produisent de l'IL-10. Cette sécrétion est spontanée pour certains (LB1 CD11b<sup>+</sup>, T3/Pré-naïf), mais peut être dépendante de différentes stimulations et induire une diminution d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et RANKL [347, 473]. Ainsi, le LPS-Pg sur le TLR4, les CpG sur le TLR9, mais également l'interaction avec un LT activé va aboutir à la prolifération des LB10 et à une augmentation de l'IL-10 [392, 472]. Une combinaison IL-21, anti-Tim1 et CD40L aboutit également à l'induction d'IL-10 et à une diminution de la perte osseuse [474].

Les LB10 sont augmentés dans les parodontites [473], car la production d'IL-10 augmente dans les parodontites sous l'influence de différents LPS-Pg [584, 585], mais leur action doit être insuffisante pour contrecarrer les effets destructeurs des autres mécanismes. L'expression de CD5 semble avoir un rôle majeur dans l'organisation de la réponse régulatrice entre les LB et les LT [240], mais la formation des LB et LT régulateurs est inhibée au niveau du front de la lésion. Ils sont probablement situés principalement dans les ZPS.

Par contre, ils doivent avoir un rôle majeur dans la résolution de l'inflammation et les processus cicatriciels après élimination du biofilm. L'effet d'une thérapie génique hIL10 chez le rat OVX avec une parodontite expérimentale induit une diminution de la perte osseuse [586]

### **e- LB1 et induction de l'ostéoclastogénèse**

Les LB1, chez la souris, sont également la population qui exprime le plus RANKL [36], bien plus que les LB2, mais cette expression n'est pas associée à une perte osseuse en l'absence de pathogènes.

À l'instar de ce qui est décrit dans la peau [336], lors d'une inflammation chronique, une augmentation substantielle des LB2 est observée à partir de LB mémoires locaux, mais aussi par le recrutement de LB mémoires ayant mûri dans les OLS. Il est possible que l'arrivée de LB mémoires Sw RANKL<sup>++</sup>, dans les parodontites, perturbe l'équilibre entre la sécrétion de sRANKL par les plasmocytes issus des LB1, voire des LB-ZM-like résidents, activés par les PAMPs et DAMPs locaux et le métabolisme osseux, aboutissant alors à une perte osseuse.

L'expression de RANKL par les LB1 est plus importante, mais les LB mémoires sont en plus grand nombre [336]. De plus, l'environnement cytokinique pro-inflammatoire dans les ZPP favoriserait un rôle destructeur des LB plutôt que protecteur, aussi bien au niveau des LB1 que des LB mémoires résidents.

Comme nous allons le discuter dans le prochain chapitre, l'expression de RANKL par les LB2 a probablement un rôle dans l'organisation de la réponse immunitaire, la lymphangiogenèse et la croissance d'un OLT au sein des tissus parodontaux. L'interaction RANKL-RANK agit comme une boucle d'amplification de la réponse immunitaire locale afin d'obtenir une réponse efficace locale et spécifique et résoudre l'infection.

### **f- LB1 et augmentation des LB CD5<sup>+</sup> dans certaines formes de parodontites**

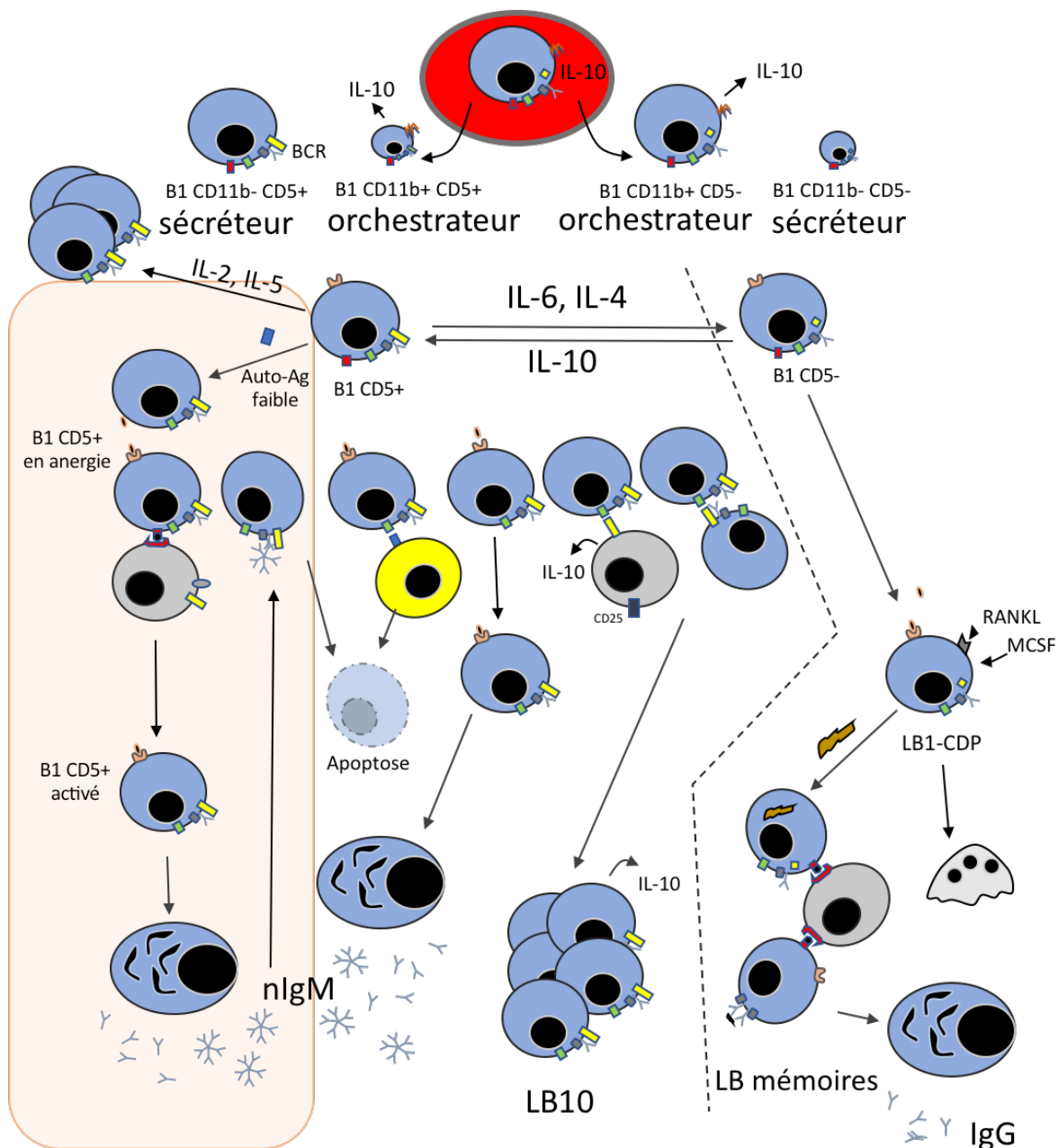
Le mécanisme que nous avons discuté concernant les orientations des LB1 CD11b<sup>+</sup> et CD11b<sup>-</sup> en fonction de l'environnement cytokinique et les FVB va à l'encontre de l'augmentation des LB CD5<sup>+</sup> observées par certains auteurs [294-297]. En effet, suivant notre hypothèse le taux de LB CD5<sup>+</sup> devrait être bas dans les atteintes sévères, ce que nous observons à la fois dans nos échantillons de gencives et dans le sang, excepté chez le patient 4.

Une augmentation d'IL-10 était associée avec une augmentation des LB CD5<sup>+</sup> chez des patients diabétiques de type I, suite à une stimulation par des LPS-Pg [464]. Cependant, les taux d'IL-10 sont rapportés comme étant plus bas chez les patients diabétiques de Type II. Il y aurait une compétition entre l'IL-10 et le glucose sur la sécrétion de RANKL et OPG [553]. L'IL-10 stimulerait la sécrétion d'OPG et inhiberait la production de RANKL et le glucose aurait l'effet inverse. Ces deux observations peuvent sembler contradictoires, mais ce qui différencie le diabète de type I du diabète de type II est son caractère auto-immun.

Ainsi un excès de régulation et un défaut de régulation pourraient être responsables par différentes voies de la mise en place d'une parodontite.

L'expression accrue de CD5 sur les LB pourrait donc être une caractéristique propre à un patient. Elle définirait ainsi un profil immunologique particulier qui pourrait être associé à une susceptibilité plus importante de ce patient à développer une atteinte parodontale sévère, où la composante auto-immune serait importante.

De plus amples recherches sont nécessaires afin d'explorer l'évolution phénotypique et fonctionnelle des LB1 au sein des gencives et du sang des patients atteints de parodontite.



**Figure 14 : Propriétés des LB1**

## II Hypothèse 2 : Présence d'organes lymphoïdes tertiaires dans les maladies parodontales ?

La formation d'organe lymphoïde tertiaire (OLT) a été recherchée, mais n'a jamais été démontrée [156, 281, 587-589]. Les conclusions actuelles sont qu'il n'y a pas de formation d'OLT dans les tissus parodontaux, car aucune structure évoquant la formation d'un CG n'a été décrite dans les tissus parodontaux. Par ailleurs, Mahanonda et al. soulignent dans leurs résultats annexes que le nombre de LTfh ( $CD4^+PD-1^+CXCR3^+CXCR5^+$ ) était négligeable

dans les tissus parodontaux et que des CG ne se formaient pas suite à l'absence d'organisation réticulaire par les fDCs [156, 281].

Cependant, les OLT sont présents dans de nombreuses situations inflammatoires chroniques [233], et sont un mécanisme normal d'organisation de la réponse immunitaire locale face à une infection non maîtrisée ou un cancer. En présence d'infection et d'inflammation chronique, un déplacement des mécanismes immunitaires vers la périphérie se met en place [15]. Ainsi, la lymphopoïèse extra médullaire se produit dans les OLS, et les mécanismes décrits dans les OLS, se déroulent directement sur place, dans les tissus présentant une inflammation non résolue [15, 233].

Pourquoi les maladies parodontales seraient une situation inflammatoire locale chronique qui répondrait différemment des autres organes en situation d'inflammation chronique, comme l'athérosclérose, la colite, certaines affections pulmonaires [233, 590-592], où la formation d'OLT est décrite ? De plus, les OLT sont également décrits dans les maladies auto-immunes, comme la PR, et dans l'organisation de la réponse immunitaire face aux tumeurs cancéreuses [233, 593-595] ; une composante auto-immune est décrite et peut caractériser certaines formes de parodontites [338, 463, 493 ].

## **1- Caractéristiques des organes lymphoïdes tertiaires**

Jones et al. en 2016 définissent les OLT comme des structures lymphoïdes non encapsulées, plus ou moins organisées [233]. Leur développement et leur fonctionnement sont calqués sur les OLS, mais ce sont des structures bien moins organisées que les OLS. Elles ne se forment pas dans un emplacement prédéfini basé sur un signal de développement, mais sont inductibles en réponse à des stimuli inflammatoires. Les OLT ont donc le potentiel de se développer dans n'importe quel tissu où persistent les phénomènes inflammatoires : les tissus parodontaux entrent dans cette catégorie. Cependant, seule une fraction des patients développe des OLT dans les tissus enflammés [233]. Le microenvironnement inflammatoire local, incluant les signaux fournis par les cellules de tissu stromal et les cellules résidentes, doit fournir des signaux spécifiques conducteurs d'une néogenèse lymphoïde pour qu'un OLT se forme. Dans les parodontites, l'environnement cytokinique oriente la différenciation, la survie et la maturation des différents types cellulaires intervenant dans les mécanismes pathogéniques ; il est probable que la réponse immunitaire dans les tissus parodontaux se coordonne et qu'une structure lymphoïde tertiaire s'organise ou cherche à s'organiser, comme cela a été suggéré par certains auteurs [298]. Par ailleurs, cet aspect individuel de la formation



des OLT est également lié à des facteurs génétiques et épigénétiques. Les lymphotoxines (LT $\alpha\beta$ , hétérodimère de LT $\alpha$  et LT $\beta$ ) ont un rôle majeur dans la formation des OLT [233] et un polymorphisme de LT $\alpha$  est associé à une plus grande susceptibilité pour les parodontites chroniques [596]. Cependant, aucun élément ne permet actuellement de dire que cette susceptibilité aux parodontites est due à une formation facilitée d'OLT ou, au contraire, à une incapacité ou une déficience dans la formation des OLT, favorisant la mise en place d'une parodontite.

Ces structures ont des rôles duals, parfois protecteurs, parfois destructeurs [233, 597] et sont associées suivant les pathologies à une évolution favorable ou défavorable [594, 595, 597]. Dans les maladies auto-immunes, spécifiques d'organe ou non, les OLT sont des structures importantes dans les mécanismes pathologiques, notamment dans l'organisation de la réponse auto-immune et son maintien [233, 534, 597]. Ils peuvent contribuer à la pathogénie en générant des cellules autoréactives effectrices, mais peuvent également limiter l'extension de la réponse et les dommages tissulaires dans les maladies auto-immunes.

La formation d'un OLT apparaît comme un élément favorable dans les réponses inflammatoires au cancer et aux infections alors qu'il est souvent un élément négatif dans les pathologies auto-immunes [233, 594, 595, 597]. De simples agrégats de LB et de LT peuvent être des signes d'un OLT et la présence d'un CG n'est pas une condition obligatoire : ces structures sont de courte durée et peuvent ne pas être suffisamment matures pour être visibles [233]. D'après Barone et al. en 2016, l'anatomie des OLT est plastique et très variable, de même que sa composition cellulaire. Alors qu'un certain degré de ségrégation des cellules LT et LB, de spécialisation vasculaire et d'expression des chémokines du tissu lymphoïde est souvent observé, le niveau d'organisation et de formation des CG dépend du contexte, du stade et du site de la réponse immunitaire [598]. Cependant, tous les auteurs ne sont pas d'accord sur cette définition et la présence de CG leur paraît un élément essentiel pour définir un OLT [599].

## **2- Développement des OLT**

Les OLS présentent une architecture cellulaire hautement organisée, comprenant des zones de cellules T séparées et des follicules de cellules B, comprenant des CG actifs, des réseaux de fDCs et un réseau vasculaire développé (High Endotheliale Venues (HEV), PNAd<sup>+</sup>(Peripheral Node Adhesin +)) permettant les interactions entre le système lymphatique

et le système sanguin. Les OLT présentent des structures similaires aux OLS et reproduisent les voies de développement embryonnaire et de maturation des OLS [233].

### **a- Développement des OLT : rapprochements avec les parodontites**

Dans le développement des OLT, les cellules immunitaires (Th17, ILC3, LT $\alpha$ i, NK, LT $\gamma$  $\delta$ , PN) peuvent se substituer aux cellules conventionnelles impliquées dans l'organogenèse lymphoïde. Leur accumulation initie la formation d'un OLT, sur les sites inflammatoires et leurs interactions avec les cellules résidentes et stromales initient la libération de chémokines homéostatiques (CXCL13, CXCL12, CCL21 et CCL19) impliquées dans le recrutement et l'organisation spatiale des cellules dans les OLT. Les molécules impliquées dans ces interactions sont IL-17, LT $\alpha$  $\beta$ , IL-22, IL-23.

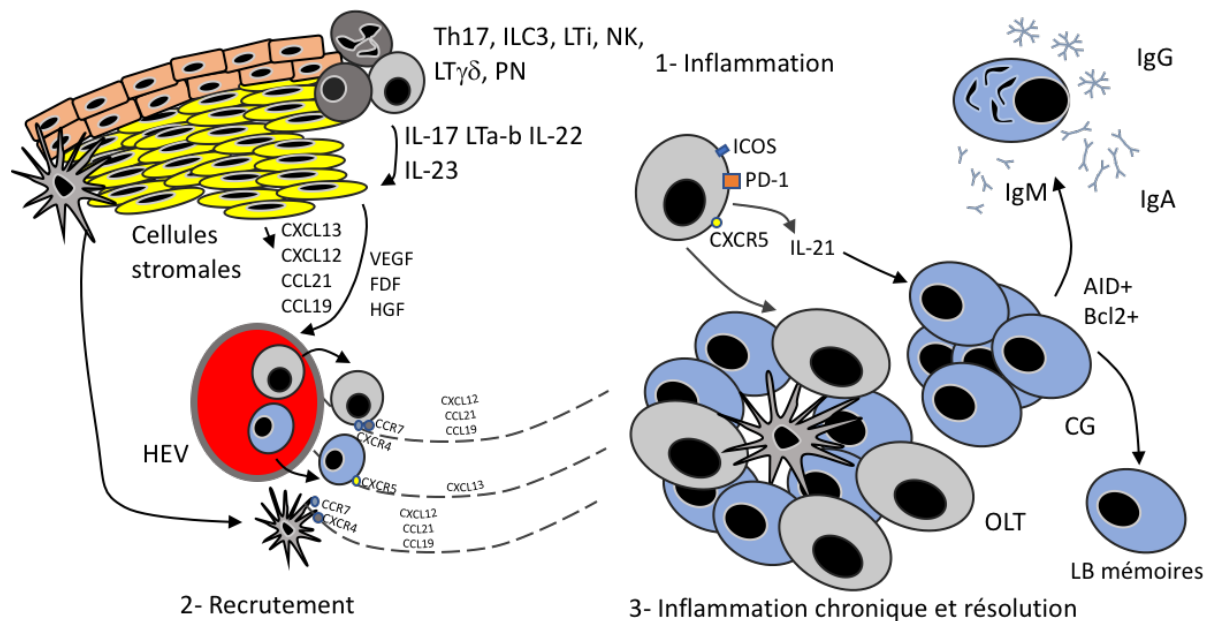
CXCL13 a été montré comme particulièrement exprimé dans les tissus parodontaux [281] et est un facteur de chimiotactisme des LB dans les tissus parodontaux [301]. CCL19 et CCL21 sont également des facteurs de recrutement des DCs et des LT, interagissant avec CCR7 et CXCL12 est le ligand de CXCR4 et a un rôle dans la migration cellulaire au sein des follicules B et des CG. Ils sont aussi décrits dans les tissus gingivaux, mais CCL21 est moins exprimé dans les conditions inflammatoires sur les vaisseaux lymphatiques [587, 600] au contraire de CCL19 qui est plus exprimé dans les tissus parodontaux [601]. CXCL12 est hautement exprimé dans les gingivites et les parodontites [156]. De même, CCL19 et CCL21 sont des ligands du CXCR7 et donc ces modifications peuvent modifier les capacités migratoires des DCs et des LT.

De même, IL-17 est très présent dans les lésions parodontales, produit notamment par les Th17 [123, 232] et IL-22 et IL-23 sont augmentés également dans les parodontites [248, 602].

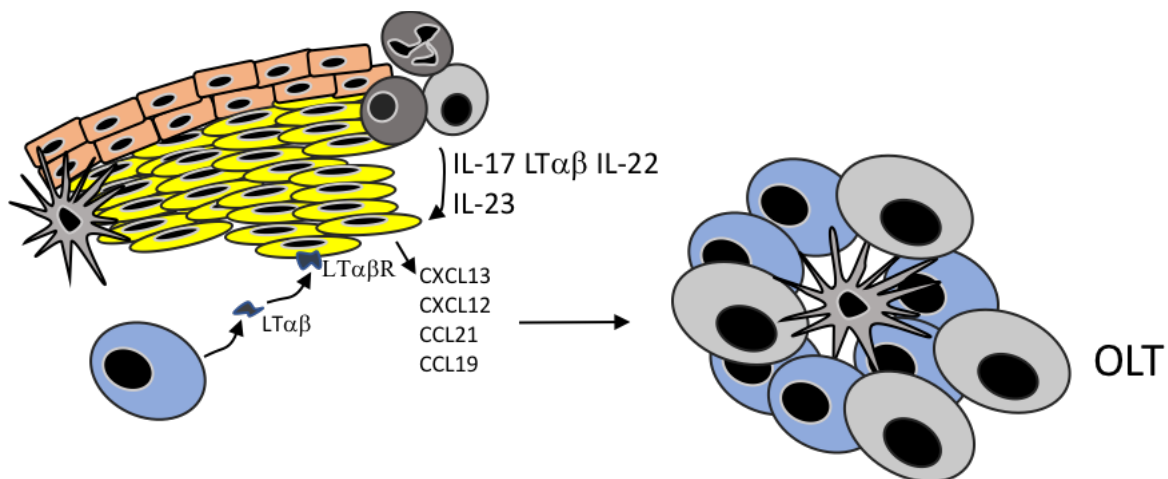
La LT $\alpha$  $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , sont requis pour permettre l'expression de chémokines de homing B (CXCR5) dans les zones B et T de la rate [603]. Cependant un polymorphisme du LT $\alpha$ , une part du LT $\alpha$  $\beta$  a été associé à une susceptibilité accrue de développer des atteintes parodontales [596, 604].

La plasticité des LT peut contribuer au développement de l'OLT grâce à l'acquisition de caractéristiques effectrices de type LTfh qui favorisent les activités des LB et la génération d'anticorps. Le Th17 est très présent dans les atteintes parodontales et est considéré comme un initiateur clé des OLT en réponse à une présence bactérienne [233]. IL-23 favorise la différenciation en LTh17 et le maintien de ce type cellulaire est capable d'induire la formation

d'un OLT.



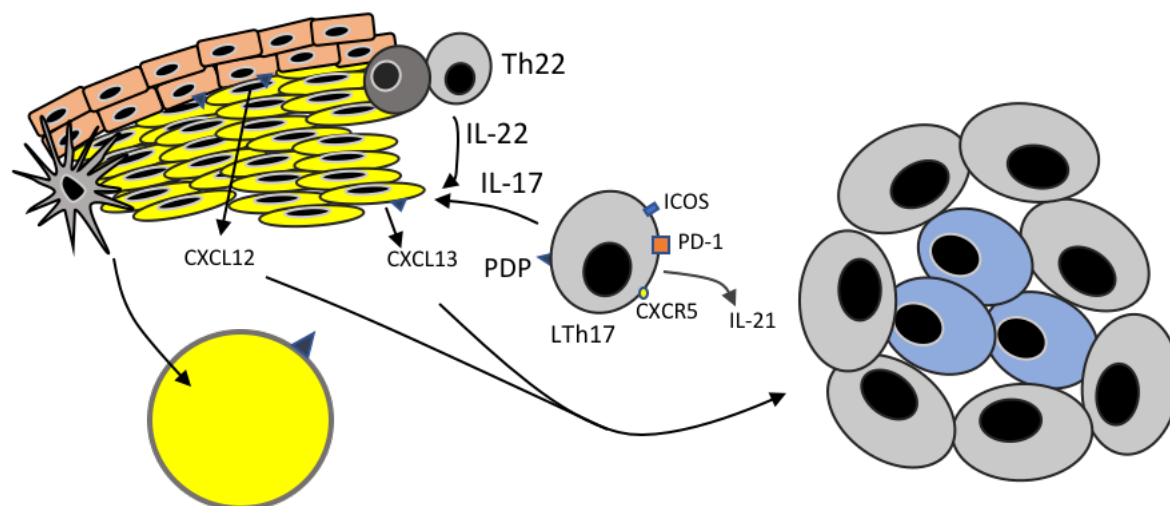
**Figure 15 : Mise en place d'un OLT**



**Figure 16 : Induction d'un OLT par LB**

Cependant, la formation d'un OLT est dépendante également de la régulation des réponses T par la podoplanin (gp38 ou PDP). La PDP est exprimée sur les épithéliums, et notamment les endothéliums des vaisseaux lymphatiques, mais elle peut être exprimée également à la surface du LTh17, notamment dans les maladies auto-immunes, les CPA CD11b+, les T mémoires, mais pas par les LT CD8+, ni les LB [233, 605]. Les Th17 semblent augmenter leur PDP quand ils sont exposés à un Ag [605]. La PDP a été décrite dans les tissus gingivaux et est exprimée sous conditions inflammatoires [606]. L'expression des PDP est décrite au niveau basal de l'épithélium gingival et au niveau des endothéliums

des vaisseaux lymphatiques, et elle augmente lors des conditions inflammatoires [606]. IL-22 induit l'expression de CXCL13 par les cellules stromales PDP<sup>+</sup> et CXCL12 par les cellules épithéliales [233]. Dans les BALT, les souris traitées *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a*), développent des OLT en l'absence de fDCs. L'IL-17 conduit la différenciation de cellules stromales en cellules PDP<sup>+</sup>CXCL12<sup>+</sup> et induit la formation de follicules B en l'absence de fDCs [607]. Des mécanismes similaires pourraient être induit par certaines bactéries Gram-du biofilm parodontal.



**Figure 17 : Rôle de la podoplanine et mise en place d'un OLT sans fDCs**

Th17 présente des fonctionnalités similaires Tfh, notamment par la sécrétion d'IL17 et d'IL-21. IL-21 a été rapporté comme étant fortement exprimé dans les parodontites [156]. L'IL-21 est par ailleurs un inducteur de la sécrétion d'IL-10 par les LB10 activés [474]. Il est surtout un élément central dans le développement des LB naïfs en plasmocytes ou en LB du GC [233].

Comme dans les OLS, les FDC peuvent soutenir le développement et la maintenance des OLT par la production de chémokines et fournir un réseau cellulaire pour la migration LB. Les ILC sont également associés au développement des OLT par l'expression d'IL-22 et la maintenance des Lymphocytes.

La migration des LB et de LT dans les OLS et les OLT passent par des HEVs (High Endothelial Venules), des structures facilement identifiables au niveau histologique. Ils expriment des molécules d'adhésion (ICAM-1...) permettant le passage des cellules inflammatoires du sang vers les tissus. Les HEVs ont été décrites dans les tissus parodontaux [557], notamment dans les tissus inflammatoires, et sont ICAM-1<sup>+</sup> et PDNaD<sup>+</sup> [156]. Les

HEVs sont aussi des éléments cruciaux dans l'activité des OLT avec les vaisseaux lymphatiques [608]. Ils ont été peu étudiés dans les tissus gingivaux [587]. Dans des conditions inflammatoires, face au *Pg*, une lymphangiogenèse est observée. Elle participe à la maintenance de l'inflammation chronique. IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  sont des promoteurs de la croissance des vaisseaux lymphatiques. La croissance des vaisseaux lymphatiques permet une meilleure clairance des bactéries et une amélioration du drainage lymphatique réduit la perte osseuse [589]. Dans les parodontites, une augmentation de VEGF a été décrite et semble avoir un rôle dans la pathogénie [609].

Pour former un OLT complètement fonctionnel, l'environnement doit être profitable pour que les LB terminent la maturation de leur affinité et leur différenciation en LB mémoire et en plasmocytes. Les LB régulent le développement des OLT et sa fonction. Ils permettent aux OLT de récapituler les fonctions des OLS.

Les Tfh supportent les réponses B dans les OLS. La relation inverse entre Blimp-1 et Bcl-6 régit la différenciation des LB en LB mémoire ou en plasmocytes producteurs d'Ig. Dans les OLT, la tolérance étant moindre que dans les OLS, les LB peuvent produire des auto-anticorps et contribuer à la progression de la maladie.

L'expression de l'AID induite par l'activation au sein des OLT marque la commutation de classe active et l'hypermutation somatique qui affine la spécificité de l'anticorps et les fonctions effectrices. En outre, les LB dans les OLT peuvent soutenir l'activation des LT, notamment la sécrétion d'IFN- $\gamma$  [610].

Les cellules B peuvent également adopter des caractéristiques de type LT<sub>i</sub>, ce qui pourrait être une des raisons de l'expression de RANKL et RANK sur les LB dans la gencive. L'interaction entre les LB et les cellules stromales résidentes conduit à la production de chémokines homéostatiques (CXCL13, CXCL12, CCL21 et CCL19) déclenchant le recrutement de nouveaux lymphocytes qui initient le développement des organes lymphoïdes.

Outre sRANKL qui est très présent dans les parodontites, l'IL-7 a probablement un rôle dans l'induction et le maintien des OLT. *Pg* est à l'origine dans la parodontite d'une augmentation de la sécrétion de l'IL-7 par les fibroblastes gingivaux [611], même si cette augmentation n'est pas toujours démontrée au sein des tissus gingivaux [612]. Dans l'étude présentée dans l'article 2 sur les effets du TCZ, l'IL-7 faisait partie des cytokines initialement étudiées, mais les taux relevés dans le CGF étaient en dessous du seuil de détection, donc nous n'avons pas pu conclure à son sujet. Il a particulièrement un rôle sur les LTfh et les LB, favorisant leur maturation en LB mémoire et ensuite leur différenciation en

plasmocytes [551]

### **b- OLT dans les parodontites**

Les mécanismes étiopathogéniques dans les maladies parodontales, et le rôle des différents types cellulaires, que nous avons décrits précédemment (Chapitre II), notamment le rôle de LB et leur différenciation dans les gencives, sont très proches de ceux décrits pour la mise en place des OLT [233]. Ainsi l'absence de CG dans les coupes histologiques de biopsies de gencives peut être associée à une immaturité des structures au moment de leur observation. Nous avons vu que les LT et LB sont plus ou moins organisés en agrégats cellulaires et que la présence de plasmocytes est importante et est elle-même située dans des zones spécifiques [156, 179, 200, 281]. Une organisation spécifique de la réponse immunitaire dans les parodontites semble transparaître sur les coupes histologiques de biopsies gingivales. Les biopsies gingivales humaines sont réalisées généralement dans les situations inflammatoires importantes et des lésions profondes, là où la réponse de l'hôte est insuffisante. Si la formation d'un OLT est favorable à la résolution de l'inflammation, et à la contention de l'infection, les OLT seront observés uniquement dans les parodontites chroniques dans les atteintes modérées ou les lésions en cours de cicatrisation, après une thérapeutique parodontale correctement menée. Ainsi, de l'échec de formation d'un OLT mature, résulte une impossibilité pour le système immunitaire à contenir la réaction inflammatoire, les destructions tissulaires et la formation d'atteintes sévères.

Une autre situation pourrait être associée à la formation d'OLT, mais dans ce cas, en tant que structure défavorable à l'évolution de l'atteinte parodontale, dans certains profils immunologiques associés à des lésions très évolutives. Ces atteintes sont minoritaires, sont associées à une agrégation familiale, et sont probablement hétérogènes au niveau des mécanismes étiopathogéniques. Certaines formes seraient associées à un défaut de régulation des réactions auto-immunes et une hyperinflammation [543], et pourraient être caractérisées par la formation d'OLT ayant un rôle, non plus protecteur, mais dans les destructions tissulaires parodontales. Peu d'études sur des biopsies gingivales ont été réalisées dans ce type de parodontite, et elles n'ont pas cherché obligatoirement ces structures [261, 609, 613, 614, 615].

Cela pourrait par ailleurs être une explication des discordances entre l'importance des destructions tissulaires observées dans les parodontites agressives et la quantité biofilm, parfois faible. Le biofilm dysbiotique reste l'étiologie de l'atteinte parodontale, mais l'impossibilité de réguler les mécanismes auto-immuns et la formation d'un OLT non

protecteur peut aboutir à une forme d'autonomisation des lésions où l'action du biofilm dysbiotique reste modérée et où la réponse immuno-inflammatoire est autoamplifiée.

Ainsi, certains profils immunologiques liés à un défaut de réponses systémiques et donc de régulation de la réponse locale pourraient être caractérisés par cette formation d'OLT non protecteur. Une déficience dans la réponse systémique, et donc d'apport de LB2 mémoires spécifiques aux Ag et activés dans les OLS, est à l'origine d'un défaut de régulation. Il n'y a alors pas de limitation la formation des OLT non-protecteur dans les ZPP et ZPS et des réponses auto-immunes, et le défaut de réponse ciblée, limite la clairance bactérienne bactérienne et favorise le développement d'un biofilm dysbiotique.

L'immaturation des OLT protecteurs peut être due à un excès de régulation. Les Tregs inhibent la formation des OLT [233]. Cet excès de régulation, éventuellement orchestré par l'action subversive de *Pg*, peut être une voie supplémentaire d'échappement au système immunitaire.

Même en dehors d'une atteinte agressive, la formation d'un OLT non protecteur pourrait être une raison du maintien de certaines lésions parodontales et l'absence de réponse au traitement dans des cas sévères où les sites dits réfractaires au traitement pourraient être associés à la présence d'OLT non protecteurs. De même, de nombreux facteurs environnementaux pourraient orienter la formation ou non d'un OLT et le type d'OLT formé.

### **c- OLT dans la gencive proche des OLT dans les fat-associated lymphoid clusters (FALCs) ?**

Les FALCS sont des tissus lymphoïdes atypiques qui ont été originellement identifiés dans les mésentères murins et humains. Ils sont localisés sur les tissus adipeux des surfaces muqueuses [616]. Ils sont structurellement moins organisés que les OLT et contiennent, quelques LT, des LB2, des fDCS, mais ils sont surtout très enrichis en LB1 [233]. Ces structures pourraient être aussi un modèle de ce qui se passe dans les parodontites.

### **3- Rôle de l'axe RANK-RANKL-OPG dans le développement des OLT**

Actuellement, aucune étude n'a relié l'axe RANK-RANKL-OPG à l'induction des OLT. Cependant, l'expression de RANKL sur les LB et les LT dans les pathologies inflammatoires chroniques [151, 157, 617], notamment celles où la présence de OLT est démontrée et leur implication dans la pathogénie de ces maladies, amène à penser que l'axe RANK-RANKL-OPG pourrait avoir un rôle majeur dans l'induction des OLT, en

reproduisant leur fonction dans les OLS.

L'axe RANK-RANKL-OPG est une voie de contrôle de la croissance des OLS, notamment des LN, et la régulation du système immunitaire chez l'adulte [143, 144]. Hess et al. en 2012 montrèrent que des souris transgéniques pour Rank (surexpression de RANK) dans les follicules pileux présentent une croissance postnatale massive de LN drainant la peau [143]. La proportion de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques et leur organisation sont maintenues, mais une augmentation de follicules B est observée. sRANKL est surproduit et sa neutralisation normalise la taille des LN, démontrant ainsi un rôle majeur de RANK-RANK-OPG dans la croissance ganglionnaire chez la souris. Les cellules stromales fibroblastiques et vasculaires réticulées expriment RANK et subissent une hyperprolifération et une sécrétion plus importante de CXCL13, CCL19 et des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1. RANKL est donc une molécule clé pour le contrôle de la plasticité du système immunitaire ; il induit la croissance du LN.

De même, l'absence de RANKL chez des souris transgéniques aboutit à une dérégulation du développement osseux et à un échec de la formation des LN [144, 618]. RANK et LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2R sont tous les deux des membres de la superfamille des TNFR et le signal passe par différentes voies NF- $\kappa$ -B [143, 144, 619, 620].

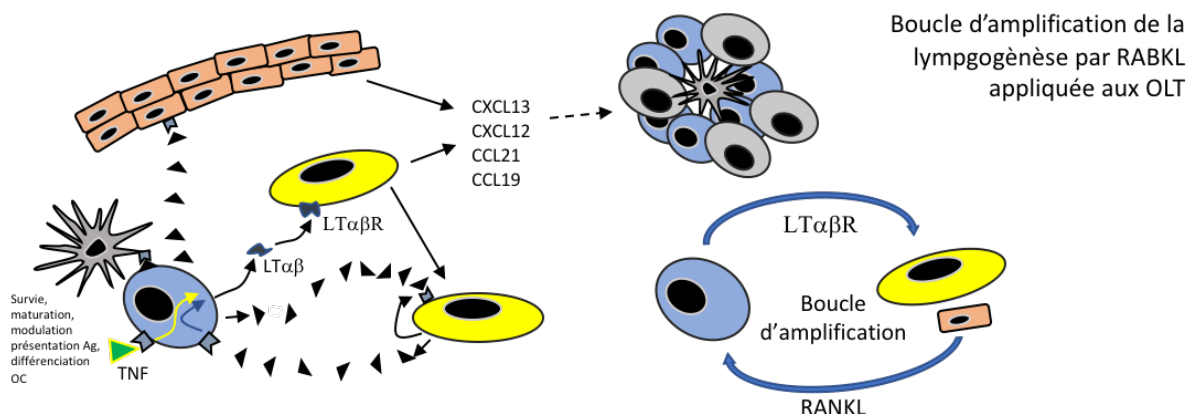
L'action de RANKL sur RANK à la surface des LTi induit la production de LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 qui va stimuler la production des LTo via LT $\alpha$  $\beta$ R. Ces derniers vont également produire RANK et les différentes formes de RANKL (soluble, clivées et membranaires) qui vont stimuler rétroactivement les LTi et amplifier le signal et l'accumulation des LTi [144]. L'expression de RANK à la surface de LTo suggère également une possible stimulation directe des LTo par RANKL.

La production de LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 est aussi régulée par d'autres facteurs que RANKL, tels que le TNF $\alpha$ , l'IL7, KLT et CXCL13. En effet, la formation des LN et des plaques de Peyer (PP) peut être distinguée par l'importance de RANKL et d'IL-7. RANKL est indispensable pour le développement des LN, alors que l'IL-7 semble l'être pour le développement des PP [621].

Dans le OLT, l'expression de RANKL doit participer à la croissance de l'OLT et forme une boucle d'amplification permettant la croissance de l'OLT. L'IL-33 peut-être inducteur l'expression des RANKL sur les LB et nous avons vu qu'il était fortement exprimé dans les parodontites, en réponse à un stimuli mécanique ou à Pg [622-624].}. Ainsi il y aurait une boucle d'amplification également dans les gencives entre les LB, notamment les LB1 qui semblent exprimer plus RANKL et l'environnement stromal qui semblent jouer le rôle de



LTo.



**Figure 18 : Boucle d'amplification de RANKL**

Le modèle de l'OLT appliqué aux parodontites permet d'expliquer l'expression de RANKL par les LB résidents et les LB arrivant sur le site. Par cette expression, ils sont capables d'orchestrer, de réguler et amplifier une réponse inflammatoire locale, mais ils induisent également une destruction osseuse permettant la croissance de la réponse immunitaire et son organisation sous forme d'OLT.

De plus amples recherches sont nécessaire pour infirmer ou cette hypothèse concernant les OLT dans les maladies parodontales. Si la présence d'OLT est avérée dans les parodontites, une meilleure compréhension des mécanismes inhérents à leur formation et une identification de leurs caractéristiques pourraient ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques en parodontologie.

Ainsi, est-ce que le type d'OLT (protecteur ou destructeur) et son organisation peut être un facteur de diagnostic ou de pronostic en parodontologie ? De même, la mise en place d'OLT ou leur absence peut-elle expliquer les destructions parodontales à elle seule ?

Une modulation de la formation des OLT, en favorisant les formes protectrices, pourrait être plus favorable à une stabilisation et une cicatrisation des lésions parodontales, après désorganisation du biofilm bactérien. Différentes immunothérapies pourraient être envisagées afin d'éviter une déplétion en LB, qui pourraient être à l'origine de nombreux effets secondaires.

### III Hypothèse 3 : La réponse immunitaire B dans les parodontites

Le rôle du LB dans les maladies parodontales est complexe. Les fonctions des LB sont variables suivant les types de LB (LB1, LB2) et de leur stade de maturation. À travers ce chapitre, nous allons présenter les rôles des différents LB au fur et à mesure de la mise en place d'une atteinte parodontale, comme l'avait présenté il y a plus de 40 ans, Page & Shroeder [32], en tenant compte à la fois de nos résultats, de l'analyse de la littérature et de nos hypothèses.

La gencive saine comporte peu de LB et cette population se répartit entre des LB1, des LB-ZM-like et des LB mémoires résidents, voire même des naïfs. La gencive saine présente toujours une inflammation minimale en réponse à un biofilm non dysbiotique. La plupart des LB sont probablement quiescents, en anergie, mais il doit y avoir un renouvellement constant des LB1, LB mémoires et LB-ZM-like [335, 336] et des recirculations entre les tissus péritonéaux et les OLS. Ce dynamisme et la présence de ces différents LB permettent l'instauration d'une réponse innée rapide dans différentes situations, une écotoxicité cellulaire fonctionnelle et la présentation de l'antigène au niveau central, et le maintien de l'homéostasie tissulaire.

Dans la gencive saine, les LB1 sont potentiellement autoréactifs et assurent ainsi une auto-immunité naturelle physiologique permettant l'élimination des débris de collagènes et des cellules apoptotiques. Les cellules CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> décrites dans la gencive saine sont probablement constituées en partie de LB1 CD11b<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup> et de quelques LB1 CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+/-</sup>. Les LB1 CD11b<sup>-</sup> représentent probablement une part importante des cellules CD20<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> décrites dans la gencive saine [294] et dans les parodontites [179, 294], et ils sont pour une bonne partie en anergie dans la gencive saine [580].

Ils vont réagir aux signaux de danger et être activés constamment. Une des fonctions potentielles des LB1 est de réagir aux dommages tissulaires (DAMPs) qui peuvent apparaître constamment lors des phases de mastication et de déglutition, donc suite à des stimuli mécaniques. Dernièrement, un rôle des LTh17 a été mis en avant dans le remaniement osseux face aux contraintes mécaniques [625, 626]; un rôle similaire pourrait être discuté pour les LB1 dans la gencive, d'autant plus que LT CD4<sup>+</sup> activés par les LB1 s'orientent préférentiellement vers le phénotype Th17 [346]. Dans cette situation, les LB1 CD11b<sup>+</sup> activés sécrètent de l'IL-10 et un équilibre doit exister entre les activations des LT et l'inhibition de leur activité par l'IL-10 [323].

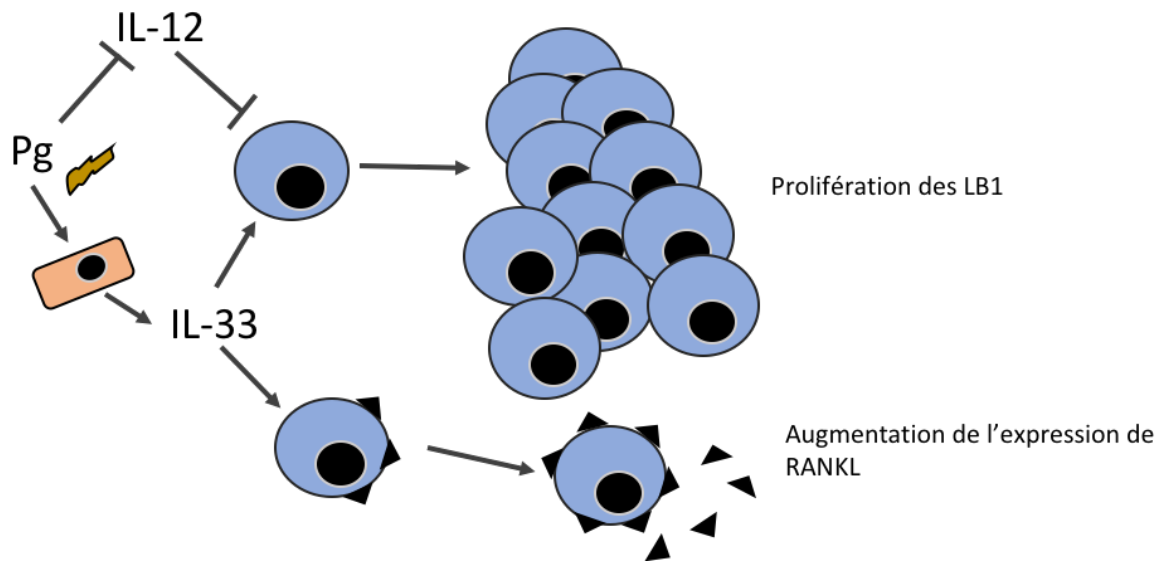
Les LB1 dans la gencive saine expriment fortement RANKL chez la souris lorsqu'ils sont activés, indépendamment de la présence bactérienne [36]. Elle n'est pas à l'origine d'une perte osseuse ; cette dernière n'apparaît qu'en présence de *Pg* et du développement d'une maturation des LB dans les OLS. Chez l'Homme, une situation similaire est probable, où la perte osseuse n'apparaît qu'avec la formation des ZPS et l'augmentation de LB mémoires Sw RANKL<sup>++</sup>.

Cette activation des LB1 dans la gencive peut donc apparaître suite à une stimulation mécanique et pourrait induire une osteoclastogénèse et une adaptation osseuse. Ce mécanisme pourrait être un nouveau rôle du LB1 dans le maintien de l'homéostasie osseuse, qui passerait par un axe IL-33-LB1-RANKL-OC. L'IL-33 est une interleukine de la famille de l'IL-1 qui est sécrétée constitutivement par les adipocytes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les muscles lisses, les monocytes et les DCs. Elle peut être produite suite à des stimuli mécaniques [623], mais également dans un contexte infectieux [622], notamment en présence de *Pg* [624]. Les gingipaines du *Pg* agissent sur un récepteur membranaire des cellules épithéliales, le PAR-2 (Protease-Activated Receptor-2) un récepteur intervenant dans le contrôle des TLR [627], notamment le TLR4. L'activation du PAR-2 par *Pg* promeut ainsi l'inflammation en augmentant la production d'IL-33.

Chez la souris, il induit également une prolifération des LB1, notamment des LB1b, une production accrue d'IgM et le recrutement de monocytes/macrophage via la libération de chémokines (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP1- $\alpha$ ) et de GM-CSF [628]. Cependant, la prolifération des LB1 est limitée par l'IL-12, sécrétée lors d'une réponse Th1.

En présence d'un biofilm dysbiotique, nous pouvons suspecter que ces mécanismes sont dérégulés et que la balance osseuse est perturbée, ce qui peut probablement expliquer la survenue d'une perte osseuse. Un stimulus mécanique va entraîner une réponse inflammatoire immédiate de type Th1 ; la sécrétion d'IL-12 va bloquer la prolifération des LB suite à l'action de l'IL-33. La présence de *Pg* va inhiber IL-12 qui ne bloquera plus la prolifération de LB1 RANKL<sup>+</sup> (figure).

Cela peut expliquer les résultats de Olliver-Bell et al. en 2015 [36] : les LB1 exprimaient RANKL de manière importante chez la souris, et beaucoup plus que les LB2, 6 semaines après un contact avec *Pg* ou un vecteur (aspect mécanique, non infectieux), mais la perte osseuse n'était observée qu'en présence de *Pg*.



***Figure 19 : Effets de l'IL-33 sur les LB et LB1 et action subversive de Pg***

Dans la lésion initiale, les bactéries du biofilm libèrent de nombreux facteurs de virulence qui vont déclencher une réaction inflammatoire. Les LB1, les LB-ZM-like et les LB mémoires résidents sont activés. Les différentes cytokines pro-inflammatoires augmentent, et la réponse immunitaire non spécifique se met en place. Les signaux perçus par les TLR sont un facteur d'activation de tous les types cellulaires de l'immunité innée. Les DCs activent localement des LT mémoires, et leur circulation vers les OLS active les LT auxiliaires et les LB. Les signaux étant relativement modérés, la mise en mémoire des LB va être majoritaire. Des LB naïfs sont probablement activés sur place (signal tonique du BCR) et migrent dans les OLS pour rencontrer les LT naïfs apparentés.

L'infiltrat inflammatoire augmente, principalement par prolifération et activation locale, notamment des LT qui sont activés par les DCs et les LB1 activés. La régulation est efficace et permet d'éviter la mise en place de destructions tissulaires. L'expression de sRANKL augmente, mais reste compensée par l'OPG. L'os alvéolaire s'adapte probablement constamment à l'infection, mais l'équilibre de la balance osseuse n'est pas rompu. Une néovascularisation se met en place pour augmenter l'apport cellulaire et l'infiltrat inflammatoire [588].

Lors de la lésion établie, l'infiltrat inflammatoire est bien en place et le biofilm se modifie, car l'environnement inflammatoire est plus favorable à la croissance des bactéries parodontopathogènes. La prolifération des LB1 est importante. Des signaux de CD40 ou des hautes doses de ligands des TLR peuvent surmonter l'état anergique des LB1 et permettre leur activation pendant l'infection [566]. Un infiltrat plasmocytaire commence à apparaître,

formant la ZPP, issu principalement de la différenciation des LB locaux, notamment des LB1. La sécrétion des Ig augmente (nIgG, nIgM, IgG spécifiques des Ag par la conversion des LB mémoires locaux). Il est probable que quelques LB mémoires issus des OLS arrivent sur le site et qu'il y ait une pénétration des LB1 Cd11b<sup>+</sup> circulants issus du péritoine, via le sang. L'inflammation est importante, mais la régulation permet de maintenir un équilibre ; il n'y a cliniquement ni perte d'attache ni perte osseuse, les deux mécanismes étant liés à l'action sRANKL [165]. L'équilibre peut être maintenu longtemps et la réponse locale avec l'activation des LB, des LB-ZM-like et des LB mémoires permet de maintenir l'homéostasie.

Plusieurs facteurs génétiques et épigénétiques peuvent aboutir à une perte d'équilibre entre le biofilm et la réponse immunitaire. Dans la lésion avancée, le biofilm est dysbiotique et une hyperinflammation s'est développée en réponse. L'environnement cytokinique en réponse aux gradients de FVB, détermine différentes zones de différenciation cellulaire.

Dans les atteintes chroniques, les diffusions de cytokines inflammatoires sont importantes au niveau systémique et la lymphopoïèse se déplace dans les OLS permettant d'augmenter la réponse adaptative, et la myélopoïèse dans la moelle osseuse. La réponse adaptative s'affine également pour mieux répondre aux Ag et une augmentation progressive de la réponse adaptative se met en place. Il est possible que dans les atteintes modérées, les LB mémoires USw soient plus prédominants que les LB mémoires Sw. L'augmentation de production de LB mémoires Sw, probablement RANKL<sup>++</sup> est à l'origine d'une augmentation des lésions tissulaires. Il est également possible que ce type cellulaire voie leur production de sRANKL augmenter sous l'action de l'IL-33 suite à leur pénétration dans les tissus.

Le pool de LB activés localement va être complété au niveau de la ZPP et les ZPS vont se former. Il y a à la fois eu une augmentation de la vascularisation sanguine et lymphatique en réponse à l'inflammation gingivale et pour la faciliter. Dès l'entrée des LB mémoires dans les tissus gingivaux, ils se différencient pour la plupart en plasmocytes et libèrent des Ig spécifiques contre les Ag du biofilm. Il existe également des activations locales de LB naïfs et de LT naïfs par les DCs. Ces LB vont sécréter également des cytokines qui vont continuer d'activer les LB1. L'environnement cytokinique va être riche en IL-6 et pauvre en IL-10 ; les LB1 pourraient perdre l'expression de CD5 et s'orienter vers un phénotype de LB1-CDP puis d'ostéoclaste-like sous l'action de RANKL et participer directement à la perte d'osseuse.

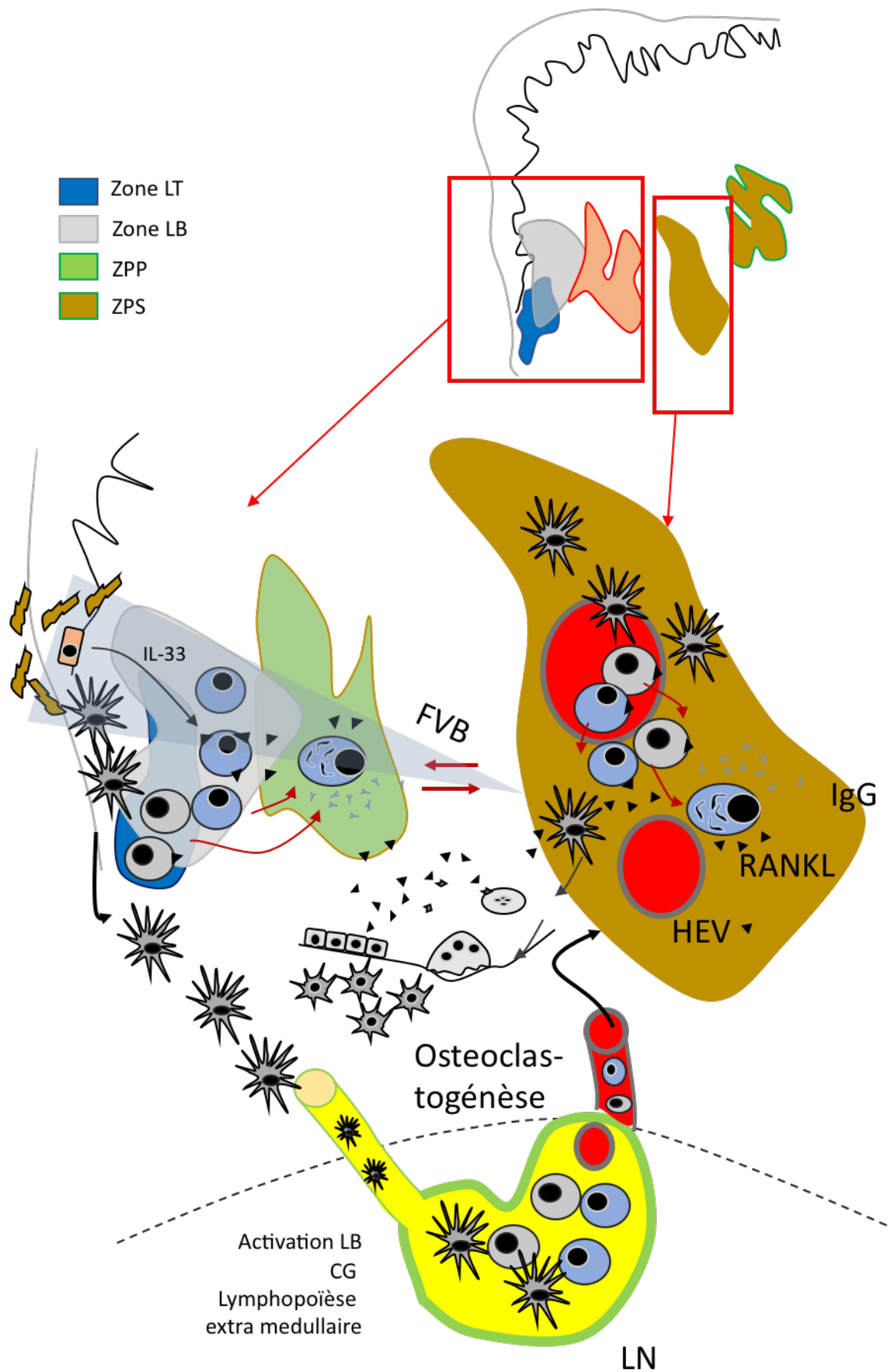
La production de sRANKL va être augmentée, d'autant plus que l'expression de RANKL augmente sur tous les LB, signe éventuellement d'une lymphopoïèse extra

médullaire. La tolérance périphérique étant moins efficace que la tolérance centrale, des LB autoréactifs issus des LB mémoires et des LB-ZM-like peuvent être libérés dans le sang et être à l'origine d'auto-anticorps et de réactions croisés avec des protéines du soi.

L'environnement cytokinique est favorable à l'organisation d'un OLT, mais la régulation est importante dans certaines zones, notamment dans les ZPS et cela peut-être une des raisons de l'absence de formation d'un OLT. De même, le biofilm dysbiotique maintient une inflammation importante et cela peut être également être à l'origine d'une immaturité permanente des OLT face au défi bactérien. L'atteinte parodontale évolue par cycle et lentement en fonction de tous les facteurs environnementaux.

Le réseau lymphatique parodontal a peu été exploré [587-589] et lorsqu'il est développé, il a un rôle protecteur. Une circulation non altérée des DCs matures aboutit au développement d'une réponse adaptative dans les OLS efficace, mais une limitation de la migration de DCs vers les OLS peut être à l'origine de plusieurs phénomènes : une réponse adaptative altérée et une accumulation de DCs matures, à l'origine d'activation locale, non contrôlée et une diminution de la clearance bactérienne.

Ainsi de multiples déficits induits ou innés peuvent faciliter la mise en place d'une maladie parodontale avec des degrés divers allant des atteintes dites chroniques, aux atteintes dites agressives, reflet probable de multiples profils immunologiques.



**Figure 20 : Réponse Immunitaire B dans les parodontites**

## IV Conclusion et perspectives d'études

L'étude pilote que nous avons effectuée a permis de mettre en avant une réponse systémique dans les parodontites sévères, et la présence de différents profils immunologiques sanguins dans les parodontites sévères. L'analyse de la littérature montre de nombreuses pistes de recherche à effectuer pour mieux comprendre le rôle des LB dans la gencive à la fois dans la gencive saine et dans les différents stades des maladies parodontales.

L'étude que nous avons présentée doit se développer, notamment avec comme premier objectif de confirmer et définir les profils immunologiques qui pourraient être associés à différentes situations cliniques. Ainsi des biomarqueurs liés à la distribution des LB dans la gencive, associé aux caractéristiques cliniques du patient, permettraient de déterminer par la biologie l'activité de l'atteinte parodontale et son pronostic.

Nous ne savons pas si ces profils immunologiques évoluent avec le temps et de quelle manière ils pourraient être influencés par un traitement parodontal conventionnel. Ainsi, une telle analyse devra se faire en 4 temps pour voir si ces profils sont constants dans le temps, si un traitement parodontal les modifie et si ces caractéristiques persistent dans le temps. En effet, il est probable que certains patients conservent certaines caractéristiques de la réponse immunitaire et n'adoptent pas un profil immunologique d'un patient sain.

L'analyse d'échantillons de gencive apparentés à différents profils immunologiques permettra de confirmer ou infirmer que la distribution des LB mémoires et des LB CD5+ reflète la distribution gingivale. Différents panels gingivaux devront être utilisés pour pouvoir distinguer les LB1, les LB-ZM-like et les LB2 dans la gencive et leur distribution. En parallèle d'une analyse en cytométrie en flux, une analyse en immunohistochimie permettrait de confirmer de notre côté la présence des ZPP et ZPP dans les parodontites et leur composition en LB, la production d'Ig, et l'organisation du néo réseau vasculaire et lymphatique, en fonction des différents profils immunologiques. Éthiquement, il semble difficile de prélever chez l'Homme avant et après un traitement parodontal réussi de la gencive pour étudier l'évolution des LB avant et après traitement : un modèle animal est à développer pour explorer nos différentes hypothèses. Ainsi sur un modèle murin de parodontite expérimentale, il serait intéressant de déterminer le rôle des différents LB résidents dans la gencive, notamment les LB1, et leurs réactions face à différents stimuli bactériens et traumatiques. À l'instar de ce qui a été fait pour la peau [336], nous pourrions étudier la circulation des LB1 CD11b<sup>+</sup> dans le sang et leur évolution dans le péritoine et la rate après l'induction d'une parodontite expérimentale et d'un traumatisme. Il sera ainsi



possible d'explorer ce qu'il se passe dans ces situations pathologiques dans les OLS, voire la moelle osseuse et ainsi mettre en avant une éventuelle lymphopoïèse extra médullaire.

Un modèle murin de parodontite expérimentale nous permettrait également de vérifier notre hypothèse sur le rôle protecteur, mais également pathologique de la réponse systémique dans les parodontites. Deux approches pourraient être envisagées : bloquer la formation des CG dans les LN et voir l'évolution des lésions parodontales suite à l'induction d'une parodontite expérimentale et bloquer la migration des différentes CPA (DC) pour favoriser une rétention tissulaire de ces différents types cellulaires.

Si le blocage de la réponse par les OLS induit une perte osseuse, cela confirmera qu'une déficience de la réponse systémique puisse être à l'origine d'une aggravation des lésions parodontales. Il faudra également bloquer cette réponse par les OLS, avant et après mise en place de la parodontite expérimentale et bien déterminer les modalités de réalisation de la parodontite expérimentale, en tenant compte du biais que peut représenter localement l'aspect traumatique de la pose d'une ligature.

De même bloquer l'écotaxie des cellules présentatrices de l'antigène vers les OLS (blocage de la migration des DC en bloquant les signaux chimiotactiques permettant la migration et l'entrée des cellules dans les vaisseaux lymphatiques), permettrait de déterminer si un mécanisme similaire est en cause dans certaines formes de parodontites et quelles influences cela pourrait avoir sur l'induction et l'évolution d'une parodontite.

Les coupes histologiques de biopsies gingivales chez l'Homme et l'animal permettraient éventuellement d'observer des structures similaires ou typiques à des OLT dans différentes situations pathologiques parodontales, notamment après traitement. Il serait cependant également intéressant d'explorer dans les tissus parodontaux, l'expression de la podoplanine, de l'AID, de RANKL et de l'IL-7 pouvant signifier la formation de telles structures ou en tout cas de leur activité fonctionnelle.

La thématique du l'étude du LB dans les maladies parodontales est vaste et de nombreuses voies sont à explorer. Une meilleure connaissance des mécanismes associés au LB peut permettre une prise en charge plus adaptée des patients. En effet, certains profils immunologiques pourraient être reliés au développement d'une atteinte parodontale autonomisée, où les mécanismes auto-immuns se développent. Différentes immunothérapies locales ou systémiques pourraient aider à résoudre ces atteintes. Nous avons exploré l'utilisation d'anti-TNF- $\alpha$ , d'anti-IL6-R, d'anti-CD20 qui peuvent avoir un intérêt dans l'amélioration de l'état parodontal. D'autres cibles seraient à étudier (IL-33, IL-17, IL-21...)

pour moduler la réponse inflammatoire ou permettre une meilleure circulation cellulaire entre les tissus, en fonctions des différents profils immunologiques.

Ce travail n'est que le premier pas dans l'engagement d'une recherche qui se promet comme vaste et riche pour mieux comprendre les maladies parodontales.

## ANNEXES



## Annexe 2 : Protocole d'étude ParoPar

### Protocole ParoPar

Eudract : n° 2012-002931-27

Ref : RC12\_0172

Ref CPP : ?

**« Etude multicentrique, prospective, sur les conséquences de l'immunothérapie anti-interleukine 6 des polyarthrites rhumatoïdes sur :**  
- le parodonte sain et pathologique  
- le niveau d'expression de certains marqueurs de l'inflammation et des bactéries parodontopathogènes dans les sulci et les poches parodontales »

**Investigateur Coordonnateur :**

**Pr Assem SOUEIDAN**  
Service d'Odontologie Restauratrice et Chirurgicale,  
Pôle Odontologie – CHU de Nantes  
1, place A. Ricordeau  
44042, Nantes cedex  
Tel : 0240412923 / Portable : 0619112579  
assem.soueidan@univ-nantes.fr

**Méthodologiste :**

**Dr. Jean-Michel NGUYEN**  
SEB (Service d'Epidémiologie et de Biostatistiques) PIMESP  
Hôpital St Jacques  
85, rue Saint Jacques  
44093 Nantes  
Tel : 0240846935 / Fax 0240846921

**Coordonnateur scientifique:**

**Dr. Hervé BOUTIGNY,**  
Chirurgien dentiste, MCU-PH, Lille

**Sites investigateurs:**

**Nantes, Rhumatologie :**  
Pr Yves MAUGARS, Dr Jean Marie Berthelot, Dr Joëlle GLEMAREC, Dr Pascale Guillot

**Nantes, Parodontologie :**  
Pr Assem SOUEIDAN, Dr Zahi BADRAN,

**Brest, Rhumatologie :**  
Pr Alain Saraux,

**Brest, Parodontologie :**  
Dr Julien Demoersman, Pr Jacques-Olivier Pers

**Promoteur :**



CENTRE HOSPITALIER  
UNIVERSITAIRE DE NANTES

**CHU de Nantes**  
Direction de la recherche  
Département promotion  
5, allée de l'île Gloriette  
44 093 Nantes cedex 01 (FRANCE)  
Contact :  
Tel : 02 53 48 28 35  
Fax : 02 53 48 28 36

**RESUME**

La Polyarthrite rhumatoïde et les Parodontites sont deux maladies inflammatoires qui partagent de très nombreuses similitudes physiopathologiques au premier rang desquelles certains médiateurs de l'inflammation comme TNF-alpha, IL-1, IL-6, IL-17, IL-12 et IL-17 ainsi que RANK-L, et OPG. Les formes les plus sévères ou évolutives de polyarthrites rhumatoïdes requièrent dans 10 à 30% des cas, le recours à des biothérapies comme les anti-TNF-alpha, anti CD-20 et anti-IL-6. Tous ces traitements ont comme conséquence, entre autres, un accroissement du risque d'infection, tant virale que bactérienne.

Ces nouvelles « biothérapies » pourraient avoir des répercussions sur l'état du parodonte, soit en favorisant la colonisation sous-gingivale des surfaces radiculaires par des bactéries parodontopathogènes, et ainsi initier une parodontite ou aggraver une parodontite pré-existante, ou bien une modulation positive de la réponse de l'hôte en inhibant la résorption osseuse des procès alvéolaires. A ce jour, très peu d'études ont été réalisées à ce sujet qui est en plein cœur de la recherche translationnelle et qui implique plusieurs spécialités médicales.

|  |  |
|--|--|
| <b>Titre de l'étude</b>                              | Etude multicentrique, prospective, sur les conséquences de l'immunothérapie anti-interleukine 6 des polyarthrites rhumatoïdes sur :<br>- le parodonte sain et pathologique<br>- le niveau d'expression de certains marqueurs de l'inflammation et des bactéries parodontopathogènes dans les sulci et les poches parodontales  |
| <b>Promoteur de l'étude</b>                          | <b>CHU DE NANTES</b>   |
| <b>Personne qui dirige et surveille la recherche</b> | Pr Assem SOUEIDAN  |
| <b>Nombre de centres prévus</b>                      | 2  |
| <b>Type d'étude</b>                                  | Médicament, phase IV   |
| <b>Planning de l'étude</b>                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Durée totale : 30 mois</li> <li>❖ Période de recrutement : 24 mois</li> <li>❖ Durée de traitement/ exposition à la méthode par patients : Non applicable</li> <li>❖ Durée de suivi par patient : 6 mois</li> </ul>  |
| <b>Design de l'étude</b>                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Multicentrique</li> <li>❖ Pilote</li> <li>❖ Prospective</li> </ul>  |
| <b>Objectifs de l'étude</b>                          | <p><u>Objectif principal</u> : L'objectif principal de cette étude pilote est d'analyser les conséquences cliniques des traitements par anti IL-6 sur la santé parodontale chez des patients porteurs de PR.</p> <p><u>Objectif secondaire</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- conséquence de cette biothérapie sur l'expression de germes associés aux parodontites.</li> <li>- analyse du fluide gingival pour révéler les modifications cytokiniques « in situ » induites par cette immunothérapie : IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, TGF-β, TNF-α, et pour mesurer l'orientation immunitaire T : IL-4 et IFN-γ (panel détecté par la technique multiplex MAP® avec la technologie Luminex® xMAP®).</li> <li>- valeur pronostique du profil cytokinique du parodonte sur la réponse au traitement biothérapique par anti-IL-6.</li> </ul> |

Etude ParoPar

|   |  |
|---|--|
| <b>Nombre de cas prévisionnel</b>   | 47 patients au total :<br>- dont 15 patients sains<br>- 32 patients atteints de parodontites   |
| <b>Calendrier des différentes visites et des différents examens</b>                   | <p><b>Visite 1- Sélection</b></p> <p>I. Patients adressés par les Services de Rhumatologie et porteurs de PR, pour lesquels un traitement par anti-IL-6 est prescrit pour la première fois afin d'exclure les patients en rotation de traitement. Ces patients sont ensuite adressés au Service de parodontologie</p> <p>II. Revue des antécédents médicaux, pathologies concomitantes et traitements concomitants</p> <p>III. Présentation du protocole au patient, information du patient : obtention de son consentement écrit et éclairé</p> <p>IV. Examen clinique et radiographie panoramique</p> <p>V. Relevé des indices cliniques (saignement, profondeur de poche, plaque)</p> <p>VI. Prélèvement du fluide gingival et prélèvement bactérien</p> <p><b>Visite 2 - à 6 mois</b> (plus ou moins 3 semaines)</p> <p>I. Revue des événements médicaux survenus depuis la date d'inclusion et traitement concomitants</p> <p>II. Examen clinique (et radiographie panoramique si cliniquement indiqué)</p> <p>III. Relevé des indices cliniques (saignement, profondeur de poche, plaque)</p> <p>IV. Prélèvement du fluide gingival et prélèvement bactérien</p> |
| <b>Critères principaux de sélection, d'inclusion, de non-inclusion et d'exclusion</b> | <p><b>Inclusion :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Patient de plus de 18 ans</li> <li>○ Souffrant de PR pour laquelle un traitement par anti-IL-6 est prescrit</li> <li>○ Au moins 18 dents permanentes en bouche dont au moins 3 dents ayant un parodonte sain</li> <li>○ Ayant exprimé leur consentement libre et éclairé par écrit</li> </ul> <p><b>Exclusion :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hypersensibilité à l'un des composants suivants : tocilizumab, saccharose, polysorbate 80, phosphate disodique dodécahydraté, phosphate monosodique dihydraté</li> <li>○ Infections sévères ou actives</li> <li>○ Pathologie systémique affectant le système immunitaire y compris le syndrome de Sjögren</li> <li>○ Intervention chirurgicale dans le mois précédent</li> <li>○ HIV positif</li> <li>○ Alcoolique</li> <li>○ Toxicomane</li> <li>○ Traitement antibiotique dans les 2 derniers mois</li> <li>○ Majeurs protégés</li> </ul>  |
| <b>Critère de jugement principal</b>  | Niveau d'attache clinique (gain ou perte d'attache clinique : GA ; PA) qui sont obtenus par sondage parodontal et calcul.  |
| <b>Critère(s) de jugement secondaire(s)</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ La détection et la quantification des germes parodontopathogènes par la technique RT-PCR dans les prélèvements bactériens seront effectuées au départ de l'étude, et six mois après le début du traitement par anti IL-6</li> <li>○ La détection et quantification des marqueurs de l'inflammation dans le fluide gingival : IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, TGF-<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-4 et IFN-<math>\gamma</math>.</li> </ul>   |

Etude ParoPar

|                             |   |
|-----------------------------|---|
|                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ L'évaluation de l'inflammation, grâce à l'indice de saignement gingival (Bleeding on probing BoP).</li> <li>○ L'évaluation du niveau d'hygiène bucco-dentaire, grâce à l'indice de plaque.</li> </ul>  |
| <b>Analyse statistiques</b> | <p>Pour le critère principal, un test de wilcoxon apparié sera utilisé. Une modélisation mixte sera utilisée pour analyser l'interaction et prendre en compte la répétition des mesures chez un même individu.</p> <p>Les dents atteintes seront comparées aux dents saines du même patient et aux dents des patients sans parodontite.</p> <p>Les analyses prendront en compte l'effet des autres variables cliniques recueillies telles que la présence de certains germes, l'indice de plaque et l'indice de saignement gingival.</p>  |
| <b>Retombées attendues</b>  | <p>Le bénéfice collectif attendu est basé sur une meilleure connaissance des effets cliniques des traitements par anti-IL-6 sur le parodonte et sur une pathologie parodontale éventuellement associée à une PR. En outre, cette étude devrait permettre une meilleure connaissance des effets de ces traitements sur la production de cytokines au niveau parodontal et sur la flore de la cavité buccale et des poches parodontales. Enfin, les effets cliniques qui seront constatés permettront d'établir une systématique transversale dans la prise en charge d'un point de vue bucco-dentaire des patients porteurs de PR et sous traitement par anti-IL-6. Enfin, les données fondamentales sur le profil cytokinique ainsi que la réponse au traitement biothérapique par anti-IL-6 pourraient contribuer à une meilleure connaissance de la pathogénie des ces deux pathologies d'expression inflammatoire.</p> |



## Annexe 3 : Protocole d'étude LBPARG



### **PARODONTITE ET INFLAMMATION : APPROCHE CLINIQUE ET BIOLOGIQUE DU RÔLE DU LYMPHOCYTE B. LBPARG**

Version V1.0 du 17/04/15

➤ Responsable de la recherche :

Pr. Jacques-Olivier PERS - CHRU de Brest, Hôpital Morvan – Laboratoire d'Immunologie –  
2 av Foch – 29609 Brest Cedex  
Tel : 02 98 32 33 84  
Mail : pers@univ-brest.fr

➤ Investigateurs associés

Cliniciens dans le service d'odontologie du CHRU de Brest  
Camille FRAMERY  
Dr Juliette COAT  
Dr Claire HENRY  
Dr Guy LETOUX  
Dr Sylvie BOISRAMÉ-GASTRIN  
Dr Cédric LANSOÑEUR

➤ Scientifiques associés

Personnel du laboratoire d'Immunologie  
Dr Julien DEMOERSMAN  
Dr Pierre POCHARD  
Dr Laetitia LE POTTIER  
Quentin SIMON

➤ Statisticien

Pr Jacques Olivier PERS

**SOMMAIRE**

**1. RESUME**

**2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE DE LA RECHERCHE.**

**3. OBJECTIF**

**4. CONCEPTION ET DEROULEMENT DE LA RECHERCHE**

**5. SELECTION ET EXCLUSION DES PERSONNES DE LA RECHERCHE**

**6. MODALITES DE RECRUTEMENT ET D'INFORMATION DES PERSONNES  
CONCERNEES**

**7. STATISTIQUES**

**8. TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES  
DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE**

**9. FINANCEMENT**

**10. PUBLICATION**

**11. BIBLIOGRAPHIE**

**12. ANNEXES**

## **Informations générales**

### **PARODONTITE ET INFLAMMATION : APPROCHE CLINIQUE ET BIOLOGIQUE DU RÔLE DU LYMPHOCYTE B.**

#### **- *Pr Jacques Olivier PERS / Dr Julien DEMOERSMAN***

- Dr Juliette COAT
- Dr Claire HENRY
- Dr Guy LETOUX
- Dr Sylvie BOISRAMÉ-GASTRIN
- Dr Cédric LANSONNEUR
- Camille FRAMERY

#### **- *Coordination et suivi de l'étude***

- Pr Jacques Olivier Pers

#### **- *Scientifiques associés***

- Dr Julien DEMOERSMAN
- Dr Laetitia LE POTTIER
- Dr Pierre POCHARD
- Quentin SIMON

#### ***Plateau technique associé***

## **1. RESUME**

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| TITRE                             | Parodontite et inflammation : approche clinique et biologique du rôle du lymphocyte B.   |
| INVESTIGATEUR RESPONSABLE         | Pr J-O Pers  |
| ACRONYME                          | LBParo   |
| JUSTIFICATION                     | Le lymphocyte B est un acteur majeur dans la mise en place et l'évolution des maladies parodontales.   |
| POPULATION CONCERNEE              | Cas : Patients souffrant de maladie parodontale chronique ou agressive.<br>Témoins : Patients ne souffrant pas de parodontite et devant subir une chirurgie dentaire incluant la réalisation d'une analyse sanguine.   |
| OBJECTIF PRINCIPAL                | Analyse du phénotype des lymphocytes B au niveau du sang et de la gencive des patients souffrant de différents types de maladies parodontales  |
| OBJECTIFS SECONDAIRES             | Evaluation des effets des traitements parodontaux sur le phénotype et la fonction des lymphocytes B<br>Etude du profil d'expression de l'agressivité des maladies parodontales par l'analyse en cytométrie en flux   |
| CRITERE D'EVALUATION PRINCIPAL    | Analyse Phénotypique des lymphocytes B dans le sang et les gencives  |
| CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES | Immunofluorescence sur échantillons de gencive<br>Analyse des constituants circulants du plasma<br>Caractérisation et mesure de différentes cytokines présentes au niveau du fluide gingival<br>Analyse microbiologique du biofilm sous-gingival   |
| METHODOLOGIE                      | Etude physiopathologique prospective monocentrique sur données clinocobiologiques<br>Analyse sur plusieurs groupes de parodontite en fonction de critères cliniques (agressive, chronique) et d'activité vs groupe contrôle sans parodontite   |
| STATISTIQUE                       | Comparaison de groupe avec variables quantitatives et qualitatives<br>Tests t de student non appariés pour les variables quantitatives paramétriques<br>Test U de Mann-Withney pour les variables quantitatives non paramétriques<br>Test de Khi-2 ou de Fisher pour les variables qualitatives<br>Test ANOVA ou de Kruskal Wallis pour la comparaison des groupes |
| CRITERE D'INCLUSION               | Cas :<br>- Homme ou femme de 18 à 75 ans avant traitement parodontal<br>- Souffrant d'une parodontite chronique ou agressive,  |

|                           |  |
|---------------------------|--|
|                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessitant une chirurgie type parodontale</li> <li>- Avec une suspicion de troubles de l'hémostase ou de la présence d'un diabète</li> <li>- En bonne santé général</li> <li>- Ayant signé leur consentement</li> </ul> <p><u>Témoins :</u><br/>Sujets majeur, sans parodontite et devant subir une extraction dentaire ou une chirurgie mucogingivale avec suspicion de troubles de l'hémostase ou la présence de diabète, en bonne santé général et ayant donné son consentement.</p>  |
| CRITERES DE NON-INCLUSION | <p><u>Cas :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mineur</li> <li>- Patient ayant pris des antibiotiques dans les 3 mois précédents l'étude</li> <li>- Patient présentant une pathologie systémique notamment pathologie inflammatoire chronique</li> <li>- Femme enceinte</li> <li>- En cours de traitement orthodontique</li> </ul> <p><u>Témoins:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mineur</li> <li>- Souffrant de parodontite</li> <li>- Prise d'antibiotiques dans les 3 mois qui précèdent l'étude</li> <li>- Femme enceinte</li> <li>- Pathologie systémique, notamment une pathologie inflammatoire chronique</li> <li>- En cours de traitement orthodontique</li> </ul> |
| NOMBRE DE PATIENTS        | 15 patients avec une parodontite chronique 15 patients avec une parodontite agressive, 30 témoins.   |
| CALENDRIER                | <p>Durée des inclusions 18 mois</p> <p>Durée de participation du patient : 3 mois</p>  |

## **2. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE DE LA RECHERCHE.**

### **2.1. Contexte de la recherche et revue de la littérature**

Les maladies parodontales, gingivites et parodontites, sont des maladies infectieuses d'origine bactérienne à manifestations inflammatoires qui affectent le parodonte. Ces infections sont de type mixte à prédominance anaérobie. Elles se traduisent par des lésions inflammatoires, confinées à la gencive dans le cas des gingivites, ou étendues à l'ensemble des tissus parodontaux dans le cas des parodontites. Elles sont alors notamment responsables d'une perte d'attache parodontale pouvant aboutir à la perte de l'organe dentaire et d'une bactériémie à distance [1].

La prévalence des différentes formes de maladies parodontales de l'adulte de plus de 18 ans varie de 40 à 55% (5 à 10% de parodontites sévères) dans les pays industrialisés [2-4].

L'inflammation et sa résolution apparaissent de plus en plus comme un élément central des maladies parodontales [5-9] et des relations mises en évidence avec de nombreuses pathologies systémiques chroniques [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. Le traitement parodontal amène à une amélioration significative du taux d'hémoglobine glyquée chez les patients diabétiques [17]. Ainsi, la recherche d'un diabète dans le cadre de la prise en charge d'une maladie parodontale peut être justifiée [18].

### **2.2. Justification de l'étude**

La réaction inflammatoire fait intervenir de nombreux acteurs de la réponse immunitaire, notamment les lymphocytes B (LB). Ce sont les cellules de l'immunité humorale, responsables de la synthèse des immunoglobulines ou anticorps face à la présence d'un antigène. Elles sont caractéristiques d'une inflammation chronique. Il existe plusieurs classes de lymphocytes B caractérisés par des antigènes de surface spécifique (marqueurs membranaires). Une fois activée, ces cellules expriment de nombreux facteurs impliqués, notamment dans l'ostéoclastogénèse (RANKL, TNF $\alpha$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$  et MCP-3) et participent ainsi aux destructions tissulaires observées dans la parodontite [19, 20].

Lors de la mise en place d'une atteinte parodontale, un important infiltrat inflammatoire est observé au sein de la gencive. Cet infiltrat est caractérisé par la présence de nombreux lymphocytes B issus du sang par diapédèse. Les sous-populations de LB présentes dans le sang et la gencive n'ont été que peu étudiées [21-24]. Cependant, le nombre de LB autoréactifs (CD19+, CD5+) a été rapporté comme étant plus élevé dans le sang des patients souffrant de maladie parodontale [25]. Dans la gencive, le taux des lymphocytes B et T augmente en fonction du niveau de l'inflammation et est corrélé avec la sévérité du processus inflammatoire. L'activation des LB est un préalable à l'évolution de la gingivite vers la parodontite [24]. Ceci suggère qu'il doit exister des lésions stables caractérisées par des LB au repos. Le LB pourrait être alors un indicateur de l'évolution de la maladie, mais aussi permettre d'étudier la réponse au traitement [26].

L'objectif de cette étude pilote est de caractériser les sous-populations des LB présentes chez un patient souffrant d'une parodontite, en fonction du type de maladie parodontale diagnostiquée et de son niveau d'activité, défini sur le plan biologique (MMP8, RANK-L). Nous chercherons ainsi à déterminer si les LB présents ont un phénotype de LB "transitionnel", de LB "immature", de LB "mature" ou de LB "mémoire" à la fois dans le sang

et dans des biopsies gingivales. L'analyse des LB dans le sang pourrait permettre de mettre en évidence l'association d'une sous-population particulière avec l'agressivité de la maladie parodontale et en évidence d'un profil biologique particulier de la réponse de l'hôte, donc du type de parodontite. Nous souhaitons également observer l'évolution de ce phénotype suite à une thérapeutique non chirurgicale classique.

Cette étude permettrait de mieux comprendre la physiopathologie des maladies parodontales et d'affiner le diagnostic, le pronostic et le traitement d'une parodontite, et ainsi participer à la mise en place d'une médecine personnalisée. Un suivi biologique des effets des thérapeutiques pourrait être instauré et permettre de prévenir plus efficacement la récidence.

### **3. OBJECTIFS**

#### **3.1. Objectif principal**

L'objectif principal est de déterminer le phénotype et la répartition des lymphocytes B au sein du sang et de la gencive des patients atteints de différentes maladies parodontales.

#### **3.2. Objectifs secondaires**

L'objectif secondaire est d'évaluer l'effet du traitement parodontal non chirurgical sur le phénotype et la fonction des lymphocytes B.

### **4. CONCEPTION ET DEROULEMENT DE LA RECHERCHE**

#### **4.1. Méthodologie de la recherche :**

Il s'agit d'une étude clinicobiologique prospective multicentrique ouverte, non randomisée, décrivant le phénotype membranaire des lymphocytes B, au niveau du sang et de la gencive, chez des patients atteints de maladie parodontale, et leur évolution avant et après traitement parodontal non chirurgical

#### **4.2. Critères d'Evaluation**

##### Critère principal d'évaluation

Evaluation par cytométrie en flux de l'expression phénotypique des LB du sang périphérique (sang total) et de la gencive.

##### Critères d'évaluation secondaire

Evaluation par immunofluorescence de la répartition des lymphocytes B et de l'expression des cytokines au sein des tissus gingivaux (analyse en microscopie confocal)

Evaluation par cytométrie en flux du phénotype des lymphocytes T au niveau du sang périphérique

Caractérisation et mesure de différentes cytokines présentes au sein du fluide gingival (technique Luminex®) des patients atteints de maladie parodontale

Analyse microbiologique du biofilm sous-gingival (par PCR quantitative) : détermination du pourcentage de parodontopathogènes.

#### 4.3. Déroulement de la recherche

Les patients seront informés de façon complète et loyale, en des termes compréhensibles, des objectifs de l'étude, de leurs droits de refuser de participer à l'étude ou de la possibilité de se rétracter à tout moment. Toutes ces informations figureront sur un formulaire d'information et de consentement remis au patient. Les prélèvements seront conservés au sein de la collection d'échantillons biologiques Humains DC 2014-2158 intitulé « OdontoBrest ».

#### Inclusion

Après avoir donné son accord, tous les patients suivis à l'hôpital de Brest pourront être inclus dans l'étude. Différents groupes de Parodontite seront comparés à un groupe de témoin (sans parodontite). Un prélèvement sanguin sera réalisé suite à la première consultation et au préalable à la réalisation d'un acte chirurgical afin, entre autres, de déterminer si un diabète n'est pas associé à l'atteinte parodontale, ou s'il n'y a pas de troubles de l'hémostase chez ce patient.

#### Méthodologie

Le patient est vu en consultation au centre de soins dentaires et une observation clinique de parodontologie est réalisée. Un diagnostic de parodontite peut alors être posée ou non et le patient peut rentrer dans l'étude en tant que "Parodontite" ou "Témoin". La participation à l'étude ne change pas la prise en charge clinique du patient.

Les prélèvements sont réalisés dans le cadre du parcours de soin du patient dans un but de diagnostic ou de dépistage (diabète et troubles de l'hémostase). Un consentement éclairé informe le patient sur les modalités de prélèvement des échantillons et leur utilisation prévue dans le cadre de la biocollection OdontoBrest (Cf. annexe 6).

L'étude est composée d'une partie observation clinique au centre de soins dentaires de Brest et d'une partie analyses biologiques au laboratoire d'immunologie de Brest.

Les techniques de laboratoire peuvent être réalisés au fur et à mesure de la réception des tubes et à posteriori, sur les échantillons congelés dans la biocollection OdontoBrest.

#### **a- En clinique, dans le service d'odontologie**

Lors de la prise en charge de patients dans le service d'odontologie, des informations cliniques et biologiques, permettant, en outre, d'établir le diagnostic de maladie parodontale, sont relevés (cf. Annexe : Protocole de prise en charge de patient en parodontologie). Ces informations sont consignées dans le dossier médical du patient sous la forme d'une fiche de recueil des données comprenant les données citées ci-dessous. Les informations relevées durant l'examen clinique sont :

- critères d'inclusion et de non inclusion et questionnaire médical
- les résultats d'analyses biologiques antérieures
- un bilan radiologique de type orthopantomogramme ou bilan long cône, ainsi qu'une analyse écrite



Cette prise en charge suit la méthodologie courante d'évaluation et de diagnostic d'une atteinte parodontale.

Au cours de la prise en charge thérapeutique courante du patient, des prélèvements gingivaux (lors d'extraction dentaire, ou d'assainissement parodontal), bactériens et sanguins seront réalisés.

Le sondage parodontal est réalisé par un seul opérateur, Mademoiselle Camille FRAMERY. L'absence de variations intra-opérateur est vérifiée (calcul Kappa).

**a.1 Prélèvement gingival**  
**(cf Annexe 1 : protocole de traitement des échantillons gingivaux)**

Le prélèvement gingival est effectué durant une intervention chirurgicale (extraction dentaire, chirurgie parodontale). L'échantillon recueilli correspond à un élément gingival devant être éliminé dans le cadre de l'intervention. Il comprend, si possible, à la fois le tissu conjonctif et les tissus épithéliaux (épithélium gingival et épithélium de poche).

Une fois prélevé, l'échantillon sera placé dans une compresse stérile, imbibée de sérum physiologique et mis dans un tube de transport. Le tube de transport, fermé hermétiquement, sera étiqueté suivant les modalités de la biocollection OdontoBrest et de l'étude (Cf. construction de la numérotation page 13), et sera transmis au laboratoire dans l'heure qui suit le prélèvement.

**a.2 Prélèvement sanguin**  
**(cf Annexe 2 : protocole de traitement des échantillons sanguins)**

Le prélèvement sanguin sera réalisé par l'IDE du service d'odontologie après le diagnostic de maladie parodontale posé ou avant une intervention chirurgicale, chez un patient sain ou un patient atteint de parodontite. Un tube sera transmis au laboratoire d'Immunologie et les autres en hématologie pour une analyse sanguine.

Les prélèvements sanguins sont réalisés dans le cadre de soin.

Le tube pour le laboratoire d'Immunologie sera fermé hermétiquement et étiqueté suivant les modalités de la Biocollection OdontoBrest, et transmis au laboratoire dans l'heure qui suit le prélèvement.

**a.3 Prélèvement de fluide gingival**  
**(cf Annexe 3 : protocole de prélèvement de fluide gingival et bactérien)**

Un prélèvement de fluide gingival est réalisé lors de l'examen clinique pour évaluer les concentrations de différentes cytokines (IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, sRANKL, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MMP8, MMP9, TIMP1, TIMP2). Les prélèvements seront congelés à -80°C. La quantification se fera par la technique multiplex MAP® avec la technologie Luminex® xMAP®. Le volume sera quantifié par pesée des pointes de papiers avant et après prélèvement, avec une balance de précision au 0,001g.

**a.4 Prélèvement bactérien**

**(cf Annexe 3 : Protocole de prélèvement de fluide gingival et bactérien)**

Un prélèvement bactérien est réalisé lors de l'examen clinique pour évaluer les bactéries présentes et affiner le diagnostic, et avant une intervention chirurgicale, lors de la réévaluation parodontale. Deux cônes de papiers sont insérés en même temps au niveau du site de prélèvement. Les cônes de papier sont ensuite mis dans des eppendorfs stériles, sans milieu particulier. Les prélèvements sont mis au congélateur à -20°C et seront analysés en PCR quantitative.

Lorsqu'une parodontite est dépistée, le prélèvement se fait au niveau des 3 sites les plus profonds, ou au niveau des dents devant bénéficier d'une intervention chirurgicale (poches profondes).

Une vérification du bon remplissage des documents électroniques, et des fiches de transfert (identification de l'échantillon dans la biocollection et fiche de contrôle et de prévention des incidents) est effectuée avant le transport vers le laboratoire.

**b- Au laboratoire d'immunologie de Brest**

**b.1 Réception des échantillons**

Les échantillons sont reçus par le Dr Julien DEMOERSMAN, le Dr Pierre POCHARD ou un personnel du laboratoire d'immunologie. Chaque échantillon est vérifié par le réceptionnaire et tout incident est notifié sur la fiche de signalement d'incident (Cf Annexe 7: Fiche de contrôle et de prévention des incidents)

Les prélèvements gingivaux et bactériens seront stockés à -80°C pour servir à des analyses ultérieures au laboratoire d'immunologie de Brest (type immunofluorescence), ou seront analysés immédiatement (type cytométrie) au laboratoire d'immunologie de Brest.

**b.2 Traitement des prélèvements gingivaux**

**(cf Annexe 1 : Protocole de traitements des prélèvements gingivaux)**

Les prélèvements gingivaux sont préparés pour une analyse en cytométrie en flux ou pour une étude en immunofluorescence.

L'analyse en cytométrie est réalisée sur des éluats de gencive obtenus par broyat. Cette analyse permettra de déterminer et de quantifier les différentes populations et sous-populations de lymphocytes B.

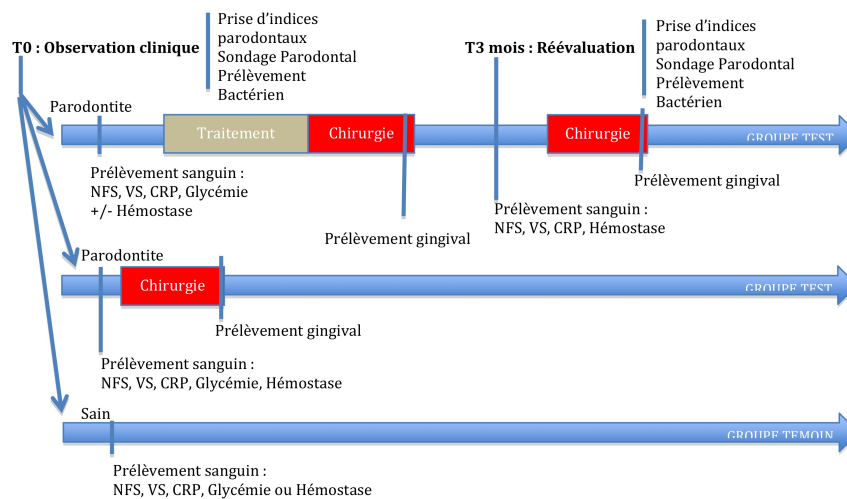
L'analyse en immunofluorescence est réalisée sur des coupes de gencives préparées à partir d'échantillons congelés. Cette analyse par microscope en confocale permettra de déterminer les phénotypes des populations de lymphocytes B et leur répartition au sein des tissus gingivaux. Cette analyse sera réalisée dans les cas où les prélèvements auront été abondants.

**b.3 Traitement des prélèvements sanguins  
(cf Annexe 2 : Protocole de traitement des échantillons sanguins).**

Une fois reçus et vérifiés, les échantillons de sang seront préparés pour les analyses en cytométrie en flux sur sang total. 3 panels de 9 à 10 couleurs sont utilisés pour étudier le phénotype des lymphocytes sanguins.

Suivi

Le suivi de la parodontite ne sera pas modifié par le protocole, la réévaluation aura lieu à 3 mois en consultation de routine pour évaluer le résultat du traitement parodontal non chirurgical. Lors de cette consultation, où une nouvelle observation clinique sera réalisée, de nouveaux prélèvements sanguins et gingivaux pourront être obtenus si une intervention de chirurgie buccale était indiquée.



***Temps possibles d'observation clinique et prélèvements durant la prise en charge d'un patient***

Le sang restant dans le tube sera centrifugé afin de séparer les cellules du plasma qui seront congelées ensuite dans le cadre de la biocollection OdontoBrest. Les cellules et le plasma congelés serviront pour des analyses ultérieures (PCR Quantitative et analyses des protéines circulantes).

## **5. POPULATION ETUDIEE**

### **5.1. Description de la population source**

La population source est constituée de sujets venant consulter dans le service d'odontologie de Brest.

Cas : Patients souffrants de maladie parodontale chronique ou agressive incluant la réalisation d'une analyse sanguine.

Témoins : Patients ne souffrant pas de parodontite mais devant subir une extraction dentaire ou une chirurgie mucogingivale incluant la réalisation d'une analyse sanguine.

### **5.2 Critères d'inclusion et de non inclusion**

#### Inclusion

- Cas :
  - âgé de plus de 18 à 75 ans
  - souffrant d'une parodontite chronique ou agressive
  - nécessitant une chirurgie type parodontale
  - avec une suspicion de troubles de l'hémostase ou de la présence d'un diabète
  - en bonne santé général
  - ayant donné son consentement
- Témoin :
  - majeur
  - Nécessitant une extraction dentaire ou une chirurgie mucogingivale
  - avec une suspicion de troubles de l'hémostase ou de la présence d'un diabète
  - en bonne santé général
  - ayant donné son consentement

#### Non-inclusion-Exclusion

- Cas :
  - mineur
  - prise d'antibiotiques dans les 3 mois qui précèdent l'étude
  - femme enceinte
  - pathologie systémique, notamment une pathologie inflammatoire chronique
  - en cours de traitement orthodontique
- Témoins:
  - mineur
  - souffrant de parodontite
  - prise d'antibiotiques dans les 3 mois qui précèdent l'étude
  - femme enceinte
  - pathologie systémique, notamment une pathologie inflammatoire chronique
  - en cours de traitement orthodontique

Le tabagisme sera pris en compte dans les différents groupes.

### 5.3 Faisabilité

Les maladies parodontales ne sont pas rares et leur prise en charge est fréquente au centre de soins dentaires.

Une analyse intermédiaire sera réalisée afin d'évaluer en cours d'étude s'il est nécessaire d'inclure un plus grand nombre de sujets.

## **6. MODALITES DE RECRUTEMENT ET D'INFORMATION DES PERSONNES CONCERNEES**

Un patient venant consulter au centre de soins et chez qui une parodontite, ou non, est diagnostiquée et nécessitant un prélèvement sanguin en vue de s'assurer de l'absence d'un diabète ou de troubles de l'hémostase pourra être recruté pour l'étude. Une fois les critères de sélection vérifiés, le protocole lui sera exposé et son accord de participation à l'étude sera recherché pour son inclusion (consentement signé). Le consentement du patient sera ainsi recherché dès le début de sa prise en charge.

Le protocole ne modifiant pas la prise en charge du sujet, il n'y a aucune pénibilité particulière pour le patient, ni aucune perte de chance possible

## **7. STATISTIQUES**

### 7.1. Responsable de l'Analyse et lieu de conservation des données

Pr Jacques Olivier PERS, CHRU de Brest, Hôpital Morvan – Laboratoire d'Immunologie et Centre de Soins Dentaires – 2 av Foch – 29609 Brest Cedex

### 7.2. Justification du nombre de sujets à inclure

Cette étude concerne 60 sujets, patients et témoins. En effet, 15 sujets par groupe (parodontite agressive, parodontite chronique) et 30 patients sans parodontite appariés en âge et en sexe seront suffisants pour répondre aux objectifs fixés.

La limite de 15 patients par groupe de patients souffrant de parodontite se justifie par un nombre moins important de patients souffrant de parodontite agressive.

### 7.3. Méthode d'analyse statistique

Comparaison de la fréquence des différentes sous-populations de LB sanguins, définie par l'expression de marqueurs membranaires, avant et après thérapeutique initiale. Les témoins sont des patients sans parodontite et sans pathologie systémique.

Une analyse intermédiaire sera réalisée afin d'évaluer en cours d'étude s'il est nécessaire d'inclure un plus grand nombre de sujets.

#### Méthode d'analyse

Les variables qualitatives seront décrites en terme d'effectif, moyenne et écart type. Les variables quantitatives seront décrites en terme d'effectif et de proportion.

Les variables quantitatives paramétriques seront comparées entre les groupes par des tests de students non appariés et les variables non paramétriques par des tests de Mann-Withney. Les variables qualitatives seront comparées par des tests de khi-2 ou des tests de Fisher, en cas de petits effectifs.

Dans le cas de plusieurs groupes à comparer (patients avec parodontite agressive, patient avec parodontite chronique, patients sans parodontite), un ANOVA sera réalisé ou un test de Kruskal Wallis dans les cas de données non paramétriques.

La limite de signification statistique est fixée à 0,005 pour l'ensemble des tests réalisés. Les analyses statistiques seront réalisées grâce au logiciel graphpad IBM SPSS au sein de l'EA2216 INSERM, ERI29, sous la responsabilité de Jacques-Olivier PERS.

## **8. TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE**

### **8.1 Cahiers d'observation (CRF) (Cf Annexe 4 : Protocole de gestion de données patients)**

Les données patients et les données de l'étude seront consignées électroniquement dans une base de données informatique au format Excel. En parallèle, deux classeurs sont mis à disposition des différents protagonistes :

- un classeur au centre de soins dentaires de Brest contenant :
  - des fiches vierges de consentement des patients de la biocollection
  - une copie des fiches de consentement signées par les patients (l'original sera conservé dans le dossier clinique du patient au CSD)
  - fiche de recueil des données comprenant les critères de sélection et questionnaire médical
  - une table de correspondance : numéro de biocollection, identité du sujet et numéro de dossier médical.
  - des fiches vierges de contrôle et de prévention des incidents
  - les protocoles de prise en charge de patients au CSD dans le cadre de l'étude
  - les protocoles de traitement des échantillons
  - les protocoles de gestion des données de l'étude
- un classeur au laboratoire d'immunologie de Brest contenant :
  - les fiches de contrôle et de prévention des incidents remplis par échantillons reçus
  - les protocoles de prise en charge de patients au CSD dans le cadre de l'étude
  - les protocoles de traitement des échantillons
  - les protocoles de gestion des données de l'étude

Un fichier électronique en format Excel sera ouvert pour l'étude (dossier informatique). Toutes les informations requises par le protocole y seront inscrites.(dossier protocoles). Il reprendra les différentes données cliniques et biologiques du patient décrites dans le protocole. Il doit comprendre les données nécessaires pour confirmer le respect du protocole, déceler les écarts majeurs au protocole et toutes les données nécessaires aux analyses. Le fichier électronique sera en partage avec le laboratoire d'immunologie et dans le centre participant à l'étude.

Il comprendra un fichier Excel anonymisé (OdontoBrest – Patients.xlsx) relié à la biocollection, un dossier comprenant les documents et les protocoles de l'étude LBParo et de

la biocollection OdontoBrest et deux dossiers d'enregistrement des données cliniques nommés :

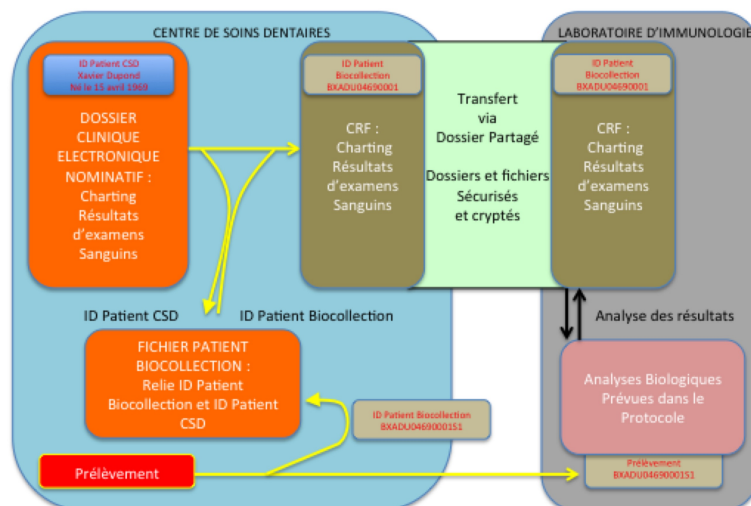
- patients étude LBParo–ID clinique, comprenant un sous dossier par patient avec, entre autres, le fichier excel ChartingParo.xlsx du patient
- patients étude LBParo –ID biocollection, comprenant les mêmes données que le précédent dossier mais sans possibilité d'identifier les patients

Le numéro de “biocollection- étude ” sera inscrit sur le consentement et inclus dans le dossier médical du patient. Ainsi lorsque le patient décide de se retirer , le clinicien communiquera le numéro de “biocollection- étude ” et les données seront supprimées de la base.

Le dossier LBParo- ID biocollection sera un dossier partagé en lecture seule avec le laboratoire d'immunologie de Brest, et au niveau d'un ordinateur dédié.

La personne responsable du remplissage des CRF électronique et des documents papiers de la biocollection sera Mlle Camille FRAMERY, étudiante en chirurgie dentaire. Les données manquantes seront notifiées dans la fiche de contrôle et de prévention des incidents.

#### Cheminement des données cliniques entre le centre de soins dentaires et le laboratoire d'immunologie



#### Construction du numéro de la biocollection : ex Xavier Dupond, né le 15 avril 1969



## 8.2. Identification des données recueillies dans le cahier d'observation

Les données recueillies dans le cahier d'observation seront des :

Données cliniques :

- antécédents médicaux
- habitudes de vie : tabagisme
- charting parodontal, indices parodontaux
- diagnostic / pronostic

Données biologiques :

- résultats des bilans sanguins

Données liées à l'étude :

- poids et site des prélèvements de fluide gingival
- sites des prélèvements bactériens
- sites des prélèvements gingivaux

## 8.2 Confidentialité

Les données sources sont conservées au sein des centres des soins participants à l'étude, dans le CRF électronique, et les dossiers cliniques des patients.

Les personnes ayant un accès direct prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus.

Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel (selon les conditions définies par les articles 226-13 et 226-14 du code pénal).

Pendant la recherche ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent et transmises par les intervenants seront rendues codées.

Afin de maintenir une confidentialité maximale, un numéro unique sera attribué au patient. Il se construira de la manière suivante, sur l'exemple de B XADU 041969 0001 S 1, où :

- B correspond au centre participant à l'étude, si à terme, plusieurs centres alimentaient la biocollection :
  - B pour Brest
- XADU correspond au deux premières lettres du nom et du prénom du patient
- 041969 correspond à la date de naissance du patient
- 0001 correspond au numéro d'entrée du patient dans la biocollection
- S correspond à la nature de l'échantillon :
  - S pour sang
  - G pour la gencive
  - B pour les bactéries
  - F pour le fluide gingival
- 1 correspond au numéro de l'échantillon

## 8.3. Déclaration CNIL

Une déclaration normale relative aux droits des personnes participant à cette recherche sont intégrées dans la non-opposition sera réalisée auprès de la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL) relative au traitement des données à caractère personnel ayant pour finalité la recherche.



Les informations relatives aux droits des personnes participant à cette recherche sont intégrées dans la non-opposition.

#### 8.4. Traitement des données

La collecte des données cliniques reposera sur la mise en place d'une base de données clinique informatique avec la création de masques de saisie à l'image du cahier d'observation en conformité avec le protocole et les réglementations actuellement en vigueur.

Un contrôle qualité final des données nécessaires à l'analyse statistique sera mis en place selon la procédure actuellement en vigueur.

La saisie des données cliniques sera effectuée par Mlle FRAMERY et la saisie des données biologiques par le Dr DEMOERSMAN. Les techniques de biologie seront réalisées par le Dr DEMOERSMAN, le Dr POCHARD ou un membre du laboratoire d'immunologie.

L'analyse des données sera réalisée par le Pr PERS, le Dr. DEMOERSMAN, le Dr POCHARD et Mlle FRAMERY.

#### 8.4. Archivage des données

Tous les cahiers et documents de l'étude devront être conservés dans une armoire fermée à clé, et archivés par l'investigateur jusqu'à publication des résultats ou durant 5 ans après la fin de la recherche.

### **9. FINANCEMENT**

#### 9.1. Ressources financières

**L'ensemble du protocole sera financé par l'EA2216, INSERM ESPRI ERI29.**

**L'EA2216, INSERM ESPRI ERI29 établira** des contrats de prestation de service pour les analyses de bactériennes avec Rennes et de fluide gingival avec Nantes, dans le cadre de leurs coopérations déjà existantes (y compris les frais de transport).

#### 9.2. Incidence financière

→ pour l'établissement

→ pour la CPAM

### **10. PUBLICATION**

Les communications et publications seront réalisées sous la responsabilité du coordonnateur de l'étude avec l'accord des investigateurs associés. Les coauteurs des publications seront les investigateurs impliqués. Les termes de « CHU de Brest » devront apparaître dans l'adresse des auteurs. Une copie des publications devra être adressée à la Délégation à la Recherche clinique.

## **11. BIBLIOGRAPHIE**

1. Pihlstrom, B.L., B.S. Michalowicz, and N.W. Johnson, *Periodontal diseases*. Lancet, 2005. **366**(9499): p. 1809-20.
2. Albandar, J.M., *Periodontal diseases in North America*. Periodontol 2000, 2002. **29**: p. 31-69.
3. Hugoson, A. and O. Norderyd, *Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years?* J Clin Periodontol, 2008. **35**(8 Suppl): p. 338-45.
4. Bourgeois, D., P. Bouchard, and C. Mattout, *Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003*. J Periodontal Res, 2007. **42**(3): p. 219-27.
5. Kantarci, A. and T.E. Van Dyke, *Resolution of inflammation in periodontitis*. J Periodontol, 2005. **76**(11 Suppl): p. 2168-74.
6. Van Dyke, T.E., *Control of inflammation and periodontitis*. Periodontol 2000, 2007. **45**: p. 158-66.
7. Van Dyke, T.E., *The etiology and pathogenesis of periodontitis revisited*. J Appl Oral Sci, 2009. **17**(1).
8. Van Dyke, T.E., *Proresolving lipid mediators: potential for prevention and treatment of periodontitis*. J Clin Periodontol, 2011. **38 Suppl 11**: p. 119-25.
9. Stashenko, P., et al., *Inflammation and genetic risk indicators for early periodontitis in adults*. J Periodontol, 2011. **82**(4): p. 588-96.
10. Almas, K., et al., *The relationship between periodontal disease and blood glucose level among type II diabetic patients*. J Contemp Dent Pract, 2001. **2**(4): p. 18-25.
11. Klebanoff, M. and K. Searle, *The role of inflammation in preterm birth--focus on periodontitis*. BJOG, 2006. **113 Suppl 3**: p. 43-5.
12. Hingorani, A.D. and F. D'Aiuto, *Chronic inflammation, periodontitis and cardiovascular diseases*. Oral Dis, 2008. **14**(2): p. 102-4.
13. Van Dyke, T.E., *Resolution of inflammation-unraveling mechanistic links between periodontitis and cardiovascular disease*. J Dent, 2009. **37**(8): p. S582-3.
14. Goldie, M.P., *The relationship of inflammation to systemic diseases and chronic periodontitis*. Int J Dent Hyg, 2010. **8**(3): p. 253-5.
15. Rethman, M.P., *Inflammation in chronic periodontitis and significant systemic diseases*. J Calif Dent Assoc, 2010. **38**(4): p. 247-57.
16. Taylor, B., et al., *The effect of initial treatment of periodontitis on systemic markers of inflammation and cardiovascular risk: a randomized controlled trial*. Eur J Oral Sci, 2010. **118**(4): p. 350-6.
17. Simpson, T.C., et al., *Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(5): p. CD004714.
18. Katagiri, S., et al., *Improvement of glycemic control after periodontal treatment by resolving gingival inflammation in type 2 diabetic patients with periodontal disease*. J Diabetes Investig, 2012. **3**(4): p. 402-9.
19. Han, X., et al., *Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 625-31.
20. Kawai, T., et al., *B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease*. Am J Pathol, 2006. **169**(3): p. 987-98.
21. Seymour, G.J. and J.S. Greenspan, *The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease*. J Periodontal Res, 1979. **14**(1): p. 39-46.
22. Cindric, G., et al., *Lymphocyte subpopulations and the expression of intercellular adhesion molecules in chronic periodontitis*. Coll Antropol, 2004. **28**(2): p. 825-32.

23. Sigusch, B.W., et al., *Evidence for a specific crevicular lymphocyte profile in aggressive periodontitis*. J Periodontal Res, 2006. **41**(5): p. 391-6.
24. Donati, M., et al., *B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions*. J Periodontal Res, 2009. **44**(5): p. 683-8.
25. Berglundh, T., et al., *The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis*. J Clin Periodontol, 2002. **29**(4): p. 281-6.
26. Suzuki, J.B., et al., *Effect of periodontal therapy on spontaneous lymphocyte response and neutrophil chemotaxis in localized and generalized juvenile periodontitis patients*. J Clin Periodontol, 1985. **12**(2): p. 124-34.

## **12. ANNEXES**

## **Annexe 1**

### **Protocole de traitement des échantillons gingivaux**

#### ***En clinique :***

- Explication de l'étude, de son intérêt et de ses objectifs
- Signature du consentement (Consentement Biocollection OdontoBrest)
- Réalisation de l'intervention chirurgicale prévue
- Prélèvement d'un fragment de gencive de 5\*5 mm minimum contenant à la fois de l'épithélium et le tissu conjonctif, dans le cadre de l'intervention
- Placement de l'échantillon dans une compresse stérile imbibée de sérum physiologique et placement dans un sachet de transport.
- Étiquetage du sachet : numéro de l'échantillon dans la biocollection – date de prélèvement -
- Remplissage du fichier excel "OdontoBrest-Patients.xlsx" : identité du patient et numéro des échantillons lui correspondant. Ce fichier ne sera accessible que par les investigateurs du centre de soins dentaires
- Remplissage de la fiche de contrôle et de prévention des incidents
- Appel du laboratoire d'immunologie pour prévenir de l'arrivée de l'échantillon
- Transport de l'échantillon et de la fiche de contrôle et de prévention des incidents au laboratoire

#### ***Au laboratoire :***

- Réception de l'échantillon
- Vérification et remplissage de la fiche de contrôle de prévention des incidents
- Rangement de la fiche de contrôle de prévention des incidents dans le classeur approprié Biocollection OdontoBrest

**Matériel :**  
- Classeur biocollection OdontoBrest

#### ***Préparation de l'échantillon***

L'échantillon est utilisé de suite pour une analyse en cytométrie en flux pour les échantillons issus du CSD de Brest.

Les échantillons issus de Nantes ou certains échantillons de Brest sont préparés pour l'analyse en immunofluorescence

#### ***Préparation de l'échantillon pour une analyse en cytométrie en flux : élution de gencive***

La biopsie est conservée à 4°C dans du Sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté. Le SVF décomplémenté et le RPMI 1640 doivent être préparés à l'avance.

- 1- Pesée de l'échantillon (balance de précision 0,0001g)
- 2- Laver l'échantillon gingival avec du Hank's
- 3- Couper la biopsie dans une boîte de pétri en très petits bouts à l'aide d'un scalpel stérile.
- 4- Broyer la gencive dans 2 ml de RPMI 1640 (doit être à température ambiante) avec un Dounce glass homogenizer ensuite directement avec le filtre dans une boîte de pétri.
- 5- Filtrer ces 2 ml avec un filtre de 70 µm et rincer avec du Hank's, le dounce et le passer dans le filtre.
- 6- Récupérer l'ensemble du liquide contenu dans la boîte de pétri
- 7- Laver les cellules avec du Hank's (doit être froid) par centrifugation 10 min à 1800 rpm à 4°C – programme 14
- 8- Eliminer le surnageant par retournement et laver une 2e fois.
- 9- Eliminer le surnageant par retournement
- 10- Resuspendre les cellules dans 1 ml de Hanks ou PBS (doit être froid) et les mettre dans la glace
- 11- Faire une numération cellulaire (20 µl de suspension cellulaire + 20 µl de bleu trypan + 160 µl de PBS)
- 12- Reprendre les cellules dans un tube de cytométrie en utilisant un filtre fin (External Filter Tips, Laboscience INC, OFT200245/MHC) à ici 500 µl par tube
- 13- Lavage des cellules à 1500 rpm 5min à 4°C – prog 19 –
- 14- Retirer le surnageant et les reprendre dans 100 µl
- 15- Ajouter les anticorps de marquage (voir tableau suivant pour le panel)
- 16- Passer les tubes dans le cytomètre et utilisation du programme LBPARO-gencive.pro



**Matériel :**  
- Hank's  
- RPMI1640  
- SVF Décomplémenté  
- Boîte de pétri  
- Précelle  
- Scalpel stérile  
- Filtre BD Falcon Cell Steiner  
- Filtre external filter tips  
- Dounce Glass homogenizer  
- Tubes de cytométrie  
- Eppendorfs  
- Falcons

17- Sauvegarde des LMD dans le répertoire correspondant à l'étude sur l'ordinateur du laboratoire. Les fichiers enregistrés doivent comprendre : numéro de biocollection et date de prélèvement

**Préparation de l'échantillon pour une analyse en immunofluorescence :**

**Congélation du fragment**

**Protocole**

Il est préférable de travailler sous hotte chimique  
Une fois la biopsie prélevée :

Remplir le récipient d'azote liquide  
Remplir le b cher d'iso-pentane et mettre ce dernier à refroidir au contact avec l'azote liquide (au minimum 1/3 du b cher doit être immergé dans l'azote liquide).  
L'iso-pentane est à la température idéale pour la congélation, lorsqu'il commence à se solidifier (présence de cristaux blancs au fond du b cher).  
Mettre une grosse goutte de résine de scellement dans une nacelle de pesée et déposer la biopsie à l'intérieur de la goutte de résine. Attention, éviter les bulles dans la résine.  
Plonger la nacelle dans l'iso-pentane refroidi pendant 2 à 3 minutes.  
Sortir la nacelle de l'iso-pentane et rogner au scalpel la résine autour de la biopsie afin qu'elle rentre dans le cryotube.  
Conserver immédiatement la biopsie à - 80 C.



**Matériel :**

- un b cher de 100 ml en plastique épais
- une plaque de polystyrène présentant un trou permettant de soutenir le b cher en plastique au-dessus d'un récipient contenant de l'azote liquide (petite boîte en polystyrène ou thermos adapté)
- iso-pentane (2-méthyl-butane GPR RECTAPUR , VWR référence 24872-298)
- azote liquide
- résine de scellement (Shandon Cryomatrix, ThermoScientific référence 6769003).
- scalpels
- cryotubes préalablement  tiqu t s avec l'identifiant du patient dans la biocollection et indiquant le tissu prélevé

**Transport**

Au moment de l'envoi, mettre le cryotube contenant le prélèvement dans un petit sac en plastique contenant de la carboglace.  
Enfouir le tout sous une quantité suffisante de carboglace dans une boîte en polystyrène expansé.  
Sceller la boîte avec de l'adhésif.  
Attention, utiliser un contenant qui respire (polystyrène) et n'est pas totalement hermétique, sinon risque d'explosion.  
Avertir le laboratoire receveur, envoyer le prélèvement en début de semaine de façon à ce qu'il soit réceptionné et transféré dans un congélateur ou une cuve à azote liquide dès son arrivée.  
Envoyer par transport express type chronopost avec livraison en mains propres.

**Cryosection des fragments cong l s**

Utiliser la machine de coupe pour réaliser de coupes fines de

**Colorations des cryosections**

**Le jour d'avant**

Préparer PFA 4% dans du PBS et le filtrer. Le conserver dans le noir à 4 C. (200 ml sont nécessaires au minimum pour réaliser un bain de fixation).

Note : il vaut mieux utiliser du PFA frais (il doit être préparé tous les 3 jours)

**La formaldéhyde est toxique. Utiliser uniquement une hotte aspirante pour préparer PFA**

- 1- Préparer du PBS frais : 1l d'eau + poudre pour PBS
- 2- Prendre la poudre pour PFA dans la chambre froide

Sous la hotte, pour réaliser 100 ml de PFA à 4%

- 1- Faire chauffer la casserole avec de l'eau pour faire chauffer à bain-marie
- 2- Peser 4 g de poudre
- 3- Dans un bécher, mettre la poudre et 100 ml de PBS, bien mélanger
- 4- Mettre à chauffer environ 30 minutes jusqu'à obtenir un mélange translucide
- 5- Filtrer le mélange dans le flacon en verre
- 6- Fermer le flacon, le nommer et le dater
- 7- Laisser refroidir au réfrigérateur jusqu'à utilisation

**Matériel :**  
PBS frais  
Poudre pour PFA  
Becher  
Casserole  
Flacon Verre + Bouchon hermétique  
Pipette Man + pipette de 50 ml  
Entonnoir  
Cône papier de filtration

#### **Le jour J**

Ne jamais se retrouver avec un dessèchement de l'échantillon

Salle avec hotte aspirante, sous la hotte

- 1- Mettre les lames le bac en verre
- 2- Rincer brièvement et avec attention les tissus dans du PBS (Il doit être préparé le jour J)
- 3- Fixer avec du PFA 4% la cryosection (en bain ou directement dans la glissière) pendant 15 minutes à température ambiante
- 4- Rincer brièvement avec du PBS les lames 2 fois, pour éliminer l'excès de PFA (mettre le PFA+PBS dans le bidon de recyclage, sous la hotte)
- 5- Conserver les lames dans le bac dans du PBS pour le transport dans la salle d'immunohistochimie

**Matériel :**  
PBS frais  
PFA 4% frais  
Anticorps primaire  
Anticorps secondaire  
Micropipettes  
Pipette Man  
Sopalin  
Bac en verre pour mettre les lames  
Plat en métal  
Eppendorfs  
Crayon gris  
Super Pat Pen

#### **Salle immunohistochimie**

- 6- Rincer 3 fois dans du PBS pendant 5 minutes à chaque fois sur les plateaux elliptiques
- 7- Pendant les phases de rinçage, préparer les anticorps pour la coloration : dilution en fonction de l'anticorps dans 100 µl (cd20= 1/10), dans un tube eppendorf
- 8- Essuyer la plaque avec du sopalin, sans toucher l'échantillon
- 9- Poser les échantillons sur le plateau en métal avec 2 pipettes+ scotch + sopalin exprimé de PBS (atmosphère humide). Couvrir d'un film aluminium
- 10- Délimiter avec le Super Pat Pen une zone autour de l'échantillon
- 11- Incuber avec le premier anticorps primaire (dilué dans du PBS) pendant 40 minutes à température ambiante. Poser une petite quantité sur l'échantillon.
- 12- Rincer 3 fois dans du PBS pendant 5 minutes à chaque fois
- 13- Incuber avec le second anticorps primaire (dilué dans du PBS) pendant 40 minutes à température ambiante
- 14- Rincer 3 fois dans du PBS pendant 5 minutes à chaque fois
- 15- Incuber l'anticorps secondaire conjugué au fluorochrome (dilué dans le PBS) pendant 40 minutes à température ambiante
- 16- Rincer 3 fois dans du PBS pendant 5 minutes à chaque fois
- 17- Monter la lamelle avec une goutte de montage - glycérine tamponnée - (Vectashield)



Version : 17/04/2015

**Panel d'analyse des échantillons gingivaux – Cytométrie en flux -**

|                               |     |               | Laser 1 488 nm |            |              |           | Laser 2 638 nm |        | Laser 3 405 nm |         | Laser 1  | Laser 2      | Protocole<br>Cytométrie |                        |
|-------------------------------|-----|---------------|----------------|------------|--------------|-----------|----------------|--------|----------------|---------|----------|--------------|-------------------------|------------------------|
| Fluorochrome                  |     |               | PE             | FITC       | PC5,5        | PC7       | APC            | AAF750 | PB             | KO      | ECD      | AAF700       |                         |                        |
| Volume<br>d'Eluat<br>(microL) |     |               | Gencive        |            |              |           |                |        |                |         |          |              |                         |                        |
| Panel G                       |     | tube Rankl    | Rankl          | CD45       | CD27         | CD38      | IgD            | DRAQ7  | IgM            | CD8     | CD5      | CD19         |                         | LBParo-<br>gencive.pro |
| vol (microL)                  | 100 |               | 20             | 5          | 3,5          | 3,5       | 3,5            | 3      | 10             | 5       | 10       | 3,5          |                         |                        |
|                               |     | tube isoRankl | iso            | CD45       | CD27         | CD38      | IgD            | DRAQ7  | IgM            | CD8     | CD5      | CD19         | LBParo-<br>gencive.pro  |                        |
| vol (microL)                  | 100 |               | 5              | 5          | 3,5          | 3,5       | 3,5            | 3      | 10             | 5       | 10       | 3,5          |                         |                        |
| Origine                       |     |               | PE254/<br>PE25 | FITC<br>45 | PC5,<br>5 27 | PC7<br>38 | APC<br>A5      | NC     | PB<br>B3       | KO<br>8 | ECD<br>5 | AAF700<br>19 |                         |                        |

**Panel d'analyse des échantillons gingivaux – Immunofluorescence -**

|                                 |     |        |   |        |     |
|---------------------------------|-----|--------|---|--------|-----|
| Mouse anti human<br><b>CD5</b>  | 65  | 1/25e  | Donkey anti-mouse IgG<br>(H+L) <b>FITC</b>      | 1/200e | 361 |
| Mouse anti human<br><b>CD19</b> | 202 | 1/100e | Donkey anti-mouse IgG<br>(H+L) <b>Rhodamine</b> | 1/200e | 299 |

## **Annexe 2**

### **Protocole de traitement des échantillons sanguins**

#### **En clinique :**

- Explication de l'étude, de son intérêt et de ses objectifs
- Signatures du consentement (Consentement Biocollection OdontoBrest et Consentement de l'étude LBParo)
- Prescription de la prise de sang : NFS, VS, CRP, Plaquettes, Cholestérol total-HDL, Triglycérides, Glycémie à jeun et/ou Bilan de l'Hémostase (TCA, TP)
- Réalisation de la prise de sang par une IDE du CSD – 1 tube est prélevé pour l'étude (tube mauve) –
- Étiquetage du tube : numéro de l'échantillon dans la biocollection – date de prélèvement
- Remplissage du fichier excel "OdontoBrest-Patients" : identité du patient et numéro des échantillons lui correspondant. Ce fichier ne sera accessible que par les investigateurs du centre de soins dentaires
- Remplissage de la fiche de contrôle et de prévention des incidents
- Appel du laboratoire d'immunologie pour prévenir de l'arrivée de l'échantillon
- Transport de l'échantillon et de la fiche de contrôle et de prévention des incidents au laboratoire

#### **Au laboratoire :**

##### **Matériel :**

- Classeur biocollection OdontoBrest

- Réception de l'échantillon
- Vérification et remplissage de la fiche de contrôle de prévention des incidents
- Rangement de la fiche de contrôle de prévention des incidents dans le classeur approprié

#### **1. Préparation de l'échantillon pour l'analyse en cytométrie en flux**

##### **Matériel :**

- Tubes de cytométrie : 1 par groupe de marquage, 3 panels (6 tubes par patients)
  - PBS ou Hank's
1. Prendre 100 µl de sang et les diluer dans 4 ml de PBS ou de Hank's
  2. Centrifuger à 200g (1200 rpm), pendant 5 minutes
  3. Retirer le surnageant de Hank's ou PBS
  4. Recommencer l'opération 2 fois
  5. Ajouter les anticorps de marquage (voir tableau suivant, en fonction du panel)
  6. Placer les tubes pour la lyse des cellules (environ 1min/tube) dans la machine de lyse (TQ-Prep)
  7. Passer les tubes dans le cytomètre et utilisation des programmes suivants :
    - panel B : LBPARO-panelB.pro
    - panel B : LBPARO-panelB1.pro
    - panel T : LBPARO-panelT.pro
  8. Sauvegarde des LMD dans le répertoire correspondant à l'étude sur l'ordinateur du laboratoire. Les fichiers enregistrés doivent comprendre : numéro de biocollection et date de prélèvement

#### **2. Préparation de l'échantillon pour la conservation du sérum et la conservation des cellules sanguines dans le cadre de la biocollection OdontoBrest**

##### **A. Récupération du sérum (P)**

1. Centrifuger les tubes de sang 10 min à 3000 rpm à température ambiante
2. Décanter le plasma et le placer dans un falcon de 10 ml
3. Étiqueter le falcon avec le numéro de la biocollection OdontoBrest et la date de congélation
4. Placer l'échantillon dans le -80 °C
5. Remplir la fiche de recensement des échantillons de la biocollection et la placer dans le classeur Biocollection OdontoBrest
6. Remplir le fichier Excel OdontoBrest-LBParo.xlsx pour le recensement des échantillons de la biocollection
7. Signaler éventuellement un incident survenu durant la préparation sur la fiche de contrôle et de prévention des incidents correspondant à la biocollection



**B. Récupération des cellules sanguine (CS) – Après récupération sérum -**

1. Préparer milieu de congélation 2X constitué de 20% de DMSO dans du sérum bovin fœtal (FBS). Ce milieu peut être stocké pendant 1 semaine à 4 ° C
2. Décanner le plasma et le placer dans un falcon de 10 ml
3. Préparer "Mr.Frosty": Retirez le support en polyéthylène haute densité flacon et l'insert en mousse de l'unité de polycarbonate. Ajouter 250 ml de 2-propanol à 100% jusqu'à la limite de remplissage (NE PAS REMPLIR). Évitez d'asperger les étiquettes le 2-propanol car l'alcool peut dissoudre d'encre. Remplacer l'alcool au bout de 5 utilisations et documenter un changement de réactif.
4. Centrifuger les cellules à 300 g pendant 10 min à température ambiante
5. Resuspendre les cellules suivant une concentration de  $2 \times 10^7$  cellules / ml dans un milieu de culture cellulaire à la température ambiante. Si le nombre de cellules est inférieur à  $1 \times 10^7$ , resuspendre les cellules dans 0,5 ml.
6. Ajouter au goutte à goutte suffisamment de milieu de congélation 2X à température ambiante pour doubler le volume de la suspension cellulaire. Remuer doucement le tube lors de l'ajout du milieu de congélation.
7. Retirer lentement la suspension cellulaire à l'aide d'une pipette et distribuer 1 ml par tube cryogénique.
8. Placer immédiatement les cryotubes dans un conteneur avec gel Mr. Frosty à température ambiante et placez le récipient de congélation dès que possible dans le congélateur à -80 ° C.
- 9- Transférer les tubes cryogéniques dans un réservoir d'azote liquide après 1 à 14 jours de congélation.

**Matériel :**

- Dimethyl sulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich, D8418)
- Inactivated fetal bovine serum (FBS)
- Culture media supplemented with glutamine, inactivated FBS and antibiotics (RPMI-1640 or DMEM)
- Cryopreservation vials (Corning life science, product #430488)
- 2-propanol (Sigma-Aldrich, I9516)
- Mr Frosty™ freezing container (Thermo-scientific, 5100-0001)

**Panels d'analyse des échantillons sanguins**

| Fluorochrome                    |                               |                      | Laser 1 488 nm |             |             |             | Laser 2 638 nm |             | Laser 3 405 nm |          | Laser 1    | Laser 2     | Protocole<br>Cytométrie |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|----------------|----------|------------|-------------|-------------------------|
|                                 |                               |                      | PE             | FITC        | PC5,5       | PC7         | APC            | AAF750      | PB             | KO       | ECD        | AAF700      |                         |
|                                 | Volume<br>Sanguin<br>(microL) |                      | Sang           |             |             |             |                |             |                |          |            |             |                         |
| <b>Panel B</b><br>vol (microL)  | 100                           | <b>tube RankI</b>    | RankI<br>15    | CD25<br>5   | CD38<br>3,5 | CD27<br>3,5 | IgD<br>3,5     | CD24<br>3,5 | IgM<br>5       | CD3<br>5 | CD5<br>5   | CD19<br>3,5 | LBParo-PanelB           |
|                                 | 100                           | <b>tube isoRankI</b> | Iso<br>3,5     | CD25<br>5   | CD38<br>3,5 | CD27<br>3,5 | IgD<br>3,5     | CD24<br>3,5 | IgM<br>5       | CD3<br>5 | CD5<br>5   | CD19<br>3,5 | LBParo-PanelB           |
| <b>Panel B1</b><br>vol (microL) | 100                           | <b>tube RankI</b>    | RankI<br>15    | CD43<br>10  | CD5<br>5    | CD27<br>5   | CD11b<br>5     | CD24<br>5   | CD20<br>5      | CD3<br>5 | CD69<br>10 |             | LBParo-PanelB1          |
|                                 | 100                           | <b>tube isoRankI</b> | Iso<br>3,5     | CD43<br>10  | CD5<br>5    | CD27<br>5   | CD11b<br>5     | CD24<br>5   | CD20<br>5      | CD3<br>5 | CD69<br>10 |             | LBParo-PanelB1          |
| <b>Panel T</b><br>vol (microL)  | 100                           | <b>tube RankI</b>    | RankI<br>15    | CD45RA<br>5 | CD27<br>5   | CD62L<br>5  | CD38<br>3      | CD3<br>1    | CD4<br>5       | CD8<br>5 | CD25<br>10 |             | LBParo-PanelT           |
|                                 | 100                           | <b>tube isoRankI</b> | Iso<br>3,5     | CD45RA<br>5 | CD27<br>5   | CD62L<br>5  | CD38<br>3      | CD3<br>1    | CD4<br>5       | CD8<br>5 | CD25<br>10 |             | LBParo-PanelT           |

### Origines des anticorps utilisés

| Panel B     |        |              | Panel B1    |       |              | Panel T     |        |              |
|-------------|--------|--------------|-------------|-------|--------------|-------------|--------|--------------|
| Marqueurs   | Fluo   | Localisation | Marqueurs   | Fluo  | Localisation | Marqueurs   | Local  | Localisation |
| RANKL       | PE     | PE254        | RANKL       | PE    | PE254        | RANKL       | PE     | PE254        |
| Iso IgG2b,k | PE     | PE25         | Iso IgG2b,k | PE    | PE25         | Iso IgG2b,k | PE     | PE25         |
| CD25        | FITC   | FITC 25      | CD43        | FITC  | FITC 43      | CD45RA      | FITC   | FITC 45RA    |
| CD38        | PC5,5  | PC5,5 38     | CD5         | PC5,5 | PC5,5 5      | CD27        | PC5,5  | PC5,5 27     |
| CD27        | PC7    | PC7 27       | CD27        | PC7   | PC7 27       | CD62L       | PC7    | PC7 62L      |
| IgD         | APC    | APC A5       | CD11b       | APC   | APC 11b      | CD38        | APC    | APC 38       |
| CD24        | AAF750 | AAF750 24    | CD24        | AF750 | AAF750 24    | CD3         | AAF750 | AAF750 3     |
| IgM         | PB     | PB B3        | CD3         | KO    | KO 3         | CD4         | PB     | PB 4         |
| CD3         | KO     | KO 3         | CD20        | PB    | PB 20        | CD8         | KO     | KO 8         |
| CD5         | ECD    | ECD 5        | CD69        | ECD   | ECD 69       | CD25        | ECD    | ECD 25       |
| CD19        | AAF700 | AAF700 19    |             |       |              |             |        |              |

### **Annexe 3**

## **Protocole de prélèvement bactérien et de fluide gingival**

#### ***En clinique :***

- Explication de l'étude, de son intérêt et de ses objectifs
- Signatures des consentements (Consentement Biocollection OdontoBrest)
- Lors de l'examen clinique initial et lors de la réévaluation, les prélèvements seront effectués au niveau du l'intervention chirurgicale doit avoir lieu, ou au niveau des 2 sites suivants les plus profonds et d'un site sain. Les zones de prélèvements seront notées dans le fichier chartingparo.xlsx du patient
- Il faut d'abord prélever le fluide gingival et ensuite les bactéries, et non l'inverse
- Lorsque les prélèvements seront réalisés à la réévaluation, les tubes eppendorf seront transportés au laboratoire et ils seront mis dans la même boîte que celle de l'évaluation initiale



#### **Matériel :**

- Classeur biocollection OdontoBrest
- Fiche de contrôle et de prévention des incidents
- Marqueur indélébile
- Tubes eppendorf secs de 0,75 ml, stérilisées
- Pbs Tween à 0,05 %
- Pipette 20-200 µl
- Chronomètre réglé sur 30 secondes
- 2 boîtes de congélation : une pour le fluide gingival et l'autre pour le prélèvement bactérien
- Etiqueteuse
- Balance de précision, au 0,001g près (marque)
- Compresses stériles
- Cônes de papier stériles
- Ruban Adhésif (Scotch)

#### ***Prélèvement du fluide gingival***

- 1- Préparer 4 tubes eppendorf : les peser avec le cône de papier qui servira au prélèvement.
- 2- Noter le poids de départ sur chartinparo.xlsx
- 3- Enlever le cône de papier stérile du tube
- 4- Isoler le site avec les cotons salivaires et compresses
- 5- Passer une compresse stérile sur la dent en cervical pour éliminer salive et biofilm en supragingival
- 6- Passer la soufflette sur la partie cervicale de la dent
- 7- Effectuer le prélèvement à l'aide du cône de papier stérile préparé pour le site, et ce durant 30 secondes
- 8- Mettre les cônes dans leur tube eppendorf respectif
- 9- Remplir les 4 tubes eppendorf avec 75 µl Pbs Tween 0,05 %
- 10- Mettre les tubes eppendorfs identifiés dans la boîte de congélation (ou dans la boîte initiale, au laboratoire)
- 11- Etiqueter la boîte de congélation avec le numéro de la biocollection du patient

#### ***Prélèvement bactérien (dans la foulée du prélèvement gingival)***

- 1- Insérer 2 cônes stériles côte à côte, attendre 30 secondes
- 2- Mettre le cône dans un tube eppendorf identifié (sans ajout de liquide)

#### **Etiquetage des tubes :**

- Identification du tube :
- 2 derniers chiffres du numéro de biocollection du patient
  - F pour fluide gingival, B pour bactérien
  - numéro de d'ordre du prélèvement
- Recouvrir la plage d'écriture avec du ruban adhésif transparent (scotch)

#### **Etiquetage des boîtes :**

- Identifier la boîte de congélation avec le numéro de biocollection du patient et le type de prélèvement (F pour Fluide et B pour Bactérien)

**Ex pour BXADU0519690001, sur le même site**

**01 F 1 en initial  
01 F 5 à la réévaluation**

**Dans la boîte de congélation  
XADU051969001F**

- 3- Mettre les tubes eppendorfs identifiés dans la boîte de congélation (ou dans la boîte initiale, au laboratoire)
- 9- Etiqueter la boîte de congélation avec le numéro de la biocollection du patient

***Au laboratoire :***

- Réception des échantillons
- Vérification de la fiche de contrôle de prévention des incidents
- Placement des boîtes de congélation au congélateur à -80°C
- Rangement de la fiche de contrôle de prévention des incidents dans le classeur approprié

***Traitement des prélèvements :***

- Envoie en groupe par transporteur spécialisé à Rennes pour les prélèvements bactériens et à Nantes pour les prélèvements de fluide gingival

Transport

Au moment de l'envoi, mettre les boîtes de congélation dans un sac plastique contenant du carboglace.

Enfouir le tout sous une quantité suffisante de carboglace dans une boîte en polystyrène expansé.

Sceller la boîte avec de l'adhésif.

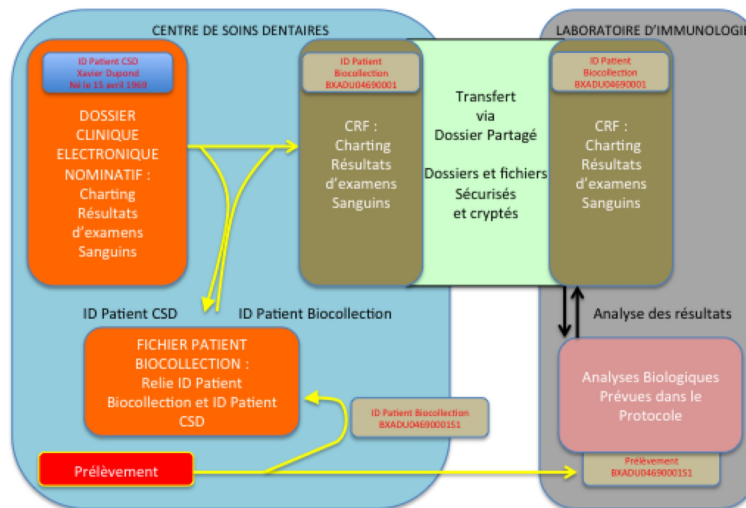
Attention, utiliser un contenant qui respire (polystyrène) et n'est pas totalement hermétique, sinon risque d'explosion.

Avertir le laboratoire receveur, envoyer le prélèvement en début de semaine de façon à ce qu'il soit réceptionné et transféré dans un congélateur à -80°C

Envoyer par transport express type chronopost avec livraison en mains propres.

## Annexe4 Protocole de gestion des données cliniques

Cheminement des données cliniques entre le centre de soins dentaires et le laboratoire d'immunologie



Construction du numéro de la biocollection : ex Xavier Dupond, né le 15 avril 1969



### ***Au centre de soins dentaires :***

Sur un ordinateur dédié du centre de soins dentaires, enregistrement des données nominatives du patient et des données non identifiables qui seront transmises au sein du réseau du CHU, via un dossier partagé. Remplissage des fichiers excel liés à l'étude : OdontoBrest-Patients.xlsx et chartingparo.xlsx

Dans un classeur dédié à l'étude :

- fiches papiers des protocoles de l'étude
- fiches vierges de contrôle et de prévention des incidents
- copies des consentements signés des patients

***Au laboratoire d'immunologie :***

Sur un ordinateur dédié du laboratoire d'immunologie, synchronisation via internet des données non identifiables du patient (chartingparo.xls) et enregistrement des résultats d'analyse biologique. Remplissage du fichier excel de recensement des échantillons reçus : OdontoBrest-LBParo.xlsx

Dans un classeur dédié à l'étude :

- fiches papier des protocoles de l'étude
- fiches de recensement des échantillons
- fiches remplies de contrôle et de prévention des incidents et rangées au fur et à mesure de la réception des échantillons

| Type d'échantillon    | Codes biocollection |
|-----------------------|---------------------|
| Sang                  | S                   |
| Gencive               | G                   |
| Fluide Gingival       | F                   |
| Prélèvement Bactérien | B                   |
| Sérum/Plasma          | P                   |
| Cellules Sanguines    | CS                  |
| Salive                | SA                  |
| Os                    | O                   |



## **Annexe 5**

### **Protocole de Prise en Charge des Patients en Parodontologie**

#### ***1re étape : Observation clinique (en plusieurs séances de soins)***

##### ***Déroulement de l'examen :***

- 1- Examen clinique exo et endobuccal
- 2- Examen radiographique – remplissage du fichier chartingparo.xls –
- 3- Photographies
- 4- Révélation de plaque – Prise de l'indice d'Oleary – remplissage du fichier chartingparo.xls
- 5- Motivation au contrôle de plaque et prescription de matériel
- 6- Détartrage
- 7- Sondage parodontal – remplissage du fichier chartingparo.xls –
- 8- Prise de l'indice Gi en même temps que le sondage – remplir le fichier chartingparo.xls –
- 10- Faire rincer le patient à l'eau si prélèvements et sondage sont réalisés dans la même séance
- 11- Prélèvements bactériens et de fluide gingival
- 12- Diagnostic et pronostic parodontal
- 13- Prescription d'un bilan sanguin : NFS, VS, CRP, Plaquettes, Cholestérol total-HDL, Triglycérides, Glycémie à jeun

##### ***2e étape : Inclusion du patient***

- Si le patient rentre dans les critères d'inclusion à l'étude.
- 1- Présentation de l'étude au patient et de la biocollection
  - 2- Signature de la fiche de consentement du patient si acceptation
  - 3- Détermination d'un numéro de biocollection et recensement dans le fichier OdontoBrest-Patients.xlsx

##### ***3e étape : Plan de traitement***

- 1- Détermination du plan de traitement global et parodontal
- 2- Prise des rendez-vous de soins et du rendez-vous pour la prise de sang auprès de l'IDE

##### ***4e étape : Actions thérapeutiques***

##### ***En fonction du plan de traitement :***

- Si pas d'extraction prévue : réalisation de la thérapeutique initiale  
Si extractions prévues : prélèvement gingival durant l'extraction et réalisation de la thérapeutique initiale

##### ***Lors de la réévaluation parodontale :***

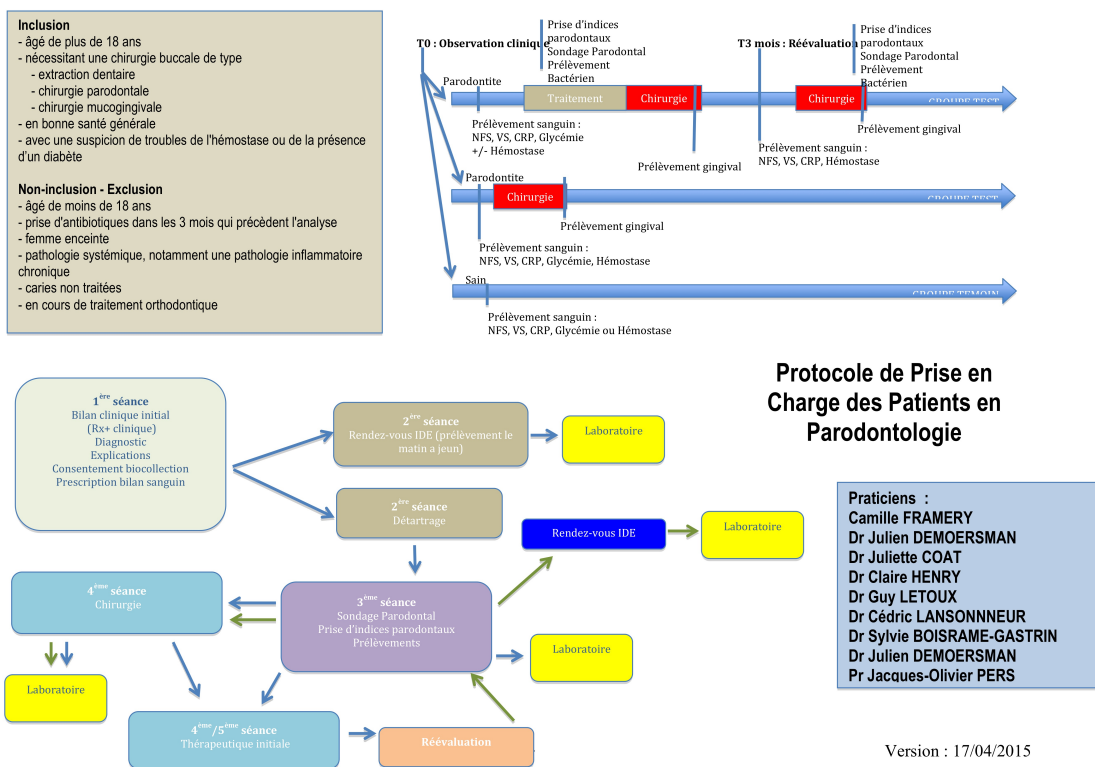
- Nouvel examen parodontal complet et prélèvements  
Décision chirurgicale : extraction dentaire, chirurgie d'assainissement  
Prescription d'un bilan sanguin : NFS, VS, CRP, Plaquettes et bilan de l'Hémostase (TCA, TP)

Réalisation des thérapeutiques chirurgicales décidées et prélèvement gingival.

##### **Matériel :**

- sonde parodontale à pression constante (marque)
- miroir
- soufflette
- compresses stériles
- cônes de papier stériles
- eppendorfs stériles
- PBS TWEEN à 0,05%
- révélateur de plaque
- ordinateur avec les fichiers suivant :
  - charting électronique (chartingparo.xlsx)
  - fiches de recensement patient biocollection (OdontoBrest - Patients.xlsx)
- fiche vierge de contrôle et de prévention des incidents

## Parodontite et inflammation : approche clinique et biologique du rôle du lymphocyte B – Annexe 3 -



## Annexe 6

### Fiche de contrôle et de prévention des incidents

**Date :** .....

**N° d'identification dans la biocollection OdontoBrest**

-     -       -         
 (2 1<sup>ères</sup> lettres du nom et prénom) - (mois et année de naissance) - N° inclusion

**Type d'échantillon :**

Sang ☐ Gencive ☐

Fluide gingival ☐ Bactéries ☐

**Nombre d'échantillons :** .....

**A remplir par l'investigateur clinique :**

**Nom :** .....

**Etapes :**

- ☐ Explication de l'étude
- ☐ Signature du consentement par le patient
- ☐ Attribution d'un numéro de biocollection au patient
- ☐ Remplissage du fichier OdontoBrest-Patients
- ☐ Examen Clinique, Prise d'indice et Sondage
- ☐ Remplissage du fichier Chartingparo
- ☐ Prescription examen sanguin

**Vérification des étiquetages et des rangements :**

- ☐ Tubes Eppendorfs correctement rangés et étiquetés
- ☐ Boîtes de congélations correctement étiquetés
- ☐ Tubes de sang correctement étiquetés
- ☐ Sachet avec échantillon gingival correctement étiqueté

**Commentaires et report d'incidents :**

.....

.....

.....

.....

.....

**A remplir par le réceptionnaire au laboratoire :**

**Nom :** .....

**Vérification des étiquetages et des rangements :**

- ☐ Tubes Eppendorfs correctement rangés et étiquetés
- ☐ Boîtes de congélations correctement étiquetées
- ☐ Tubes de sang correctement étiquetés
- ☐ Sachet avec échantillon gingival correctement étiqueté

**Réception :**

- ☐ Rangement des boîtes de congélations dans le congélateur -80°C
- localisation du congélateur : .....
- étagère de stockage : .....
- ☐ Traitement des échantillons de sang et de gencive

**Commentaires et report d'incidents :**

.....

.....


.....

.....

.....



**Annexe 7**  
**Fiche d'inclusion des cas et des témoins**

|  |  |
|--|--|
|   | Parodontite et inflammation :<br>Approche clinique et biologique du rôle des lymphocytes B<br>LBPARO |
| Identification du Cas    _ _ - _ _ .- _ _  _ _  _ _ - _ _  _ _  <br>(2 <sup>es</sup> lettres du nom et prénom) - (mois et année de naissance) – N° inclusion |  |

**INCLUSION DES CAS**

Date d'inclusion   |\_|\_|   |\_|\_|   |\_|\_|


| CRITRES D'INCLUSION  | OUI | NON |
|--|-----|-----|
| Age ≥ 18 ans   |     |     |
| Souffrant d'une parodontite chronique ou agressive,                          |     |     |
| Nécessitant une chirurgie type parodontale                                   |     |     |
| Avec une suspicion de troubles de l'hémostase ou de la présence d'un diabète |     |     |
| En bonne santé général   |     |     |
| Ayant signé leur consentement<br>- <b>Date</b>  _ _   _ _   _ _              |     |     |

*Si une ou plusieurs cases « NON » sont cochées le patient n'est pas inclus*

| CRITRES DE NON INCLUSION  | OUI | NON |
|---|-----|-----|
| Mineur  |     |     |
| Patient ayant pris des antibiotiques dans les 3 mois précédents l'étude                   |     |     |
| Patient présentant une pathologie systémique notamment pathologie inflammatoire chronique |     |     |
| Femme enceinte  |     |     |
| Patient en cours de traitement orthodontique  |     |     |

*Si une ou plusieurs cases « OUI » sont cochées le patient n'est pas inclus*

**Date :** |\_|\_| |\_|\_| |\_|\_|  
**Nom de l'investigateur :**  
**Signature**

|   |  |
|---|--|
|  | Parodontite et inflammation :<br>Approche clinique et biologique du rôle des lymphocytes B<br>LBPARO   |
|   | Identification du Cas <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/><br>(2 <sup>èmes</sup> lettres du nom et prénom ) - (mois et année de naissance) – N° inclusion |

## INCLUSION DES TEMOINS

Date d'inclusion

| CRITRES D'INCLUSION  | OUI | NON |
|--|-----|-----|
| Age ≥ 18 ans   |     |     |
| Nécessitant une extraction dentaire ou une chirurgie mucogingivale   |     |     |
| Ayant une suspicion de troubles de l'hémostase ou de la présence d'un diabète  |     |     |
| En bonne santé général   |     |     |
| Ayant signé leur consentement<br>- <b>Date</b> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |     |     |

*Si une ou plusieurs cases « NON » sont cochées le patient n'est pas inclus*

| CRITRES DE NON INCLUSION   | OUI | NON |
|--|-----|-----|
| Mineur   |     |     |
| Souffrant d'une parodontite chronique ou agressive,<br>- prise d'antibiotiques dans les 3 mois qui précèdent l'étude |     |     |
| Patient présentant une pathologie systémique notamment pathologie inflammatoire chronique                            |     |     |
| Femme enceinte   |     |     |
| Patient en cours de traitement orthodontique   |     |     |

*Si une ou plusieurs cases « OUI » sont cochées le patient n'est pas inclus*

Date :        
 Nom de l'investigateur :  
 Signature



**Centre Hospitalier Régional Universitaire de Brest**  
**Laboratoire d'Immunologie**  
**Pr Pers Tel : 02-98-22-23-84**

**Information et consentement du patient à la conservation et à l'utilisation d'échantillons biologiques à des fins de recherche incluant éventuellement un examen des caractéristiques génétiques**

Madame, Monsieur,

Lors de votre prise en charge dans le service d'odontologie, le chirurgien dentiste va être amené à réaliser éventuellement l'extraction d'une ou plusieurs dents, l'ablation d'un kyste, la réalisation d'un assainissement parodontal ou périapical, la pose d'un implant. Vos soins vont induire la réalisation de prélèvements de tissus, de sérum, de plasma, de cellules et/ou de fluides buccaux (salive).

Une partie de ces échantillons sera conservée pour une utilisation dans le cadre de votre traitement.

Une autre partie pourra, sauf opposition de votre part, être utilisée pour la recherche médicale ou scientifique, dans le respect de la confidentialité. Nous envisageons des recherches sur les maladies de la sphère bucco-dentaire. Cette recherche peut nécessiter un examen des caractéristiques immunologiques ou génétiques après prélèvement. Un tel examen nécessite votre accord, que vous pouvez exprimer en signant le présent document.

Les échantillons seront conservés au laboratoire d'immunologie dont le responsable est le Pr Yves Renaudineau au sein de la collection OdontoBrest enregistrée sous le N° DC-2014-2158. Votre accord est révocable à tout moment. (Vous pouvez, dans ce cas, joindre le laboratoire (secrétariat tel : 02-98-22-33-84) au CHRU de Brest.

Date de la délivrance de l'information :  
oui ☐ non

Accord exprimé : ☐

Le médecin :

Service : .....

N° Téléphone : .....

Signature du médecin

**Etiquette**

Identité du patient

Ou

Nom, prénom, date de naissance

Signature du patient

Conformément à la loi ( art.13-1 et 16.6 du code civil), ces prélèvements ne pourront être cédés à titre commercial, ni donner lieu à rémunération à votre bénéfice. Ils pourront être utilisés pour des recherches effectuées en partenariat avec un ou plusieurs organismes publics ou privés.

Les données médicales associées aux prélèvements seront réunies sur un fichier informatique permettant leur traitement automatisé dans le cadre des recherches. Vous disposez à leur égard d'un

droit de rectification et d'opposition conformément à la loi du 6 janvier 1978 modifiée. Afin de respecter la confidentialité, ces données seront systématiquement codées.

Les informations portées sur ce document sont confidentielles et couvertes par le secret médical. À aucun moment, les données personnelles qui y figurent n'apparaîtront lors de la publication des résultats des travaux de recherche.



**EXTRAIT DU PROCES VERBAL DU COMITE D'ETHIQUE**

**SEANCE DU 09 Avril 2015**

**Sous la présidence par intérim du Docteur Véronique AMICE**

**COMITE D'ETHIQUE**

**Présidente par intérim**

Dr Véronique Amice  
Biologie de la reproduction  
[Veronique.amice@chu-brest.fr](mailto:Veronique.amice@chu-brest.fr)

**Vice Présidente**

Mme Patricia Le Gall  
Infirmière en psychiatrie  
[Patricia.loisel@chu-brest.fr](mailto:Patricia.loisel@chu-brest.fr)

**Secrétaire**

M. Rémi BRAJEUL  
Directeur Adjoint  
[Remi.brajeul@chu-brest.fr](mailto:Remi.brajeul@chu-brest.fr)

**Secrétariat**  
02 98 22 39 66

**Titre du protocole**

« Parodontite et inflammation : approche clinique et biologique du rôle du lymphocyte B – LBParo ».

Protocole version V1.4 du 17/04/15, consentement institutionnel proposé dans le cadre de la déclaration de la biocollection OdontoBrest (DC 2014-2158).

Ce protocole est soumis par le Pr Jacques-Olivier Pers du laboratoire d'Immunologie du CHRU de Brest.

**Justification de l'étude :**

Les maladies parodontales, gingivites et parodontites, sont des maladies infectieuses d'origine bactérienne à manifestations inflammatoires qui affectent le parodonte. Elles se traduisent par des lésions inflammatoires, confinées à la gencive dans le cas des gingivites, ou étendues à l'ensemble des tissus parodontaux dans le cas des parodontites. Elles sont alors responsables d'une perte d'attache parodontale pouvant aboutir à la perte de l'organe dentaire et d'une bactériémie à distance.

La réaction inflammatoire, élément central de la maladie parodontale, fait intervenir de nombreux acteurs de la réponse immunitaire, notamment les lymphocytes B (LB). Ce sont les cellules de l'immunité humorale, responsables de la synthèse des immunoglobulines ou anticorps face à la présence d'un antigène. Elles sont caractéristiques d'une inflammation chronique. Il existe plusieurs classes de lymphocytes B caractérisés par des antigènes de surface spécifique (marqueurs membranaires). Une fois activée, ces cellules expriment de nombreux facteurs impliqués, notamment dans l'ostéoclastogénèse (RANKL, TNF $\alpha$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$  et MCP-3) et participent ainsi aux destructions tissulaires observées dans la parodontite.

Lors de la mise en place d'une atteinte parodontale, un important infiltrat inflammatoire est observé au sein de la gencive. Cet infiltrat est caractérisé par la présence de nombreux lymphocytes B issus du sang par diapédèse. Les sous-populations de LB présentes dans le sang et la gencive n'ont été que peu étudiées. Cependant, le nombre de LB autoréactifs (CD19+, CD5+) a été rapporté comme étant plus élevé dans le sang des patients souffrant de maladie parodontale. Dans la gencive, le taux des lymphocytes B et T augmente en fonction du niveau de l'inflammation et est corrélé avec la sévérité du processus inflammatoire. L'activation des LB est un préalable à l'évolution de la gingivite vers la parodontite ce qui suggère qu'il doit exister des lésions stables caractérisées par des LB au repos. Le LB pourrait être alors un indicateur de l'évolution de la maladie, mais aussi permettre d'étudier la réponse au traitement.

L'objectif de cette étude pilote est de caractériser les sous-populations des LB présentes chez un patient souffrant d'une parodontite, en fonction du type de maladie parodontale diagnostiqué et de son niveau d'activité, défini sur le plan biologique (MMP8, RANK-L). Cette étude permettra de déterminer si les LB présents ont un phénotype de LB "transitionnel", de

LB "immature", de LB "mature" ou de LB "mémoire" à la fois dans le sang et dans des biopsies gingivales. L'analyse des LB dans le sang pourrait permettre de mettre en évidence l'association d'une sous-population particulière avec l'agressivité de la maladie parodontale et un profil biologique particulier de la réponse de l'hôte, donc du type de parodontite.

Cette étude permettrait donc de mieux comprendre la physiopathologie des maladies parodontales, d'en affiner le diagnostic, le pronostic et le traitement d'une parodontite et ainsi participer à la mise en place d'une médecine personnalisée. Un suivi biologique des effets des thérapeutiques pourrait être instauré et permettre de prévenir plus efficacement la récurrence.

**Population concernée :**

Cas : Patients souffrant de maladie parodontale chronique ou agressive.

Témoins : Patients ne souffrant pas de parodontite et devant subir une chirurgie dentaire incluant la réalisation d'une analyse sanguine.

**Objectif principal :**

Analyse du phénotype des lymphocytes B au niveau du sang et de la gencive des patients souffrant de différents types de maladies parodontales

**Critère de jugement principal :**

Analyse Phénotypique des lymphocytes B dans le sang et les gencives

**Méthodologie :**

Etude physiopathologique prospective monocentrique sur données clinico-biologiques

Analyse sur plusieurs groupes de parodontite en fonction de critères cliniques (agressive, chronique) et d'activité vs groupe contrôle sans .

**Nombre de sujets prévus :**

15 patients avec une parodontite chronique 15 patients avec une parodontite agressive, 30 témoins.

**Déroulement de l'étude :**

Le protocole est exposé au patient venant consulter au centre de soins dentaire du CHRU de Brest et chez qui un diagnostic de parodontite, ou non, est réalisé, nécessitant un prélèvement sanguin en vue de s'assurer de l'absence d'un diabète ou de troubles de l'hémostase. Son accord de participation à l'étude est alors recherché pour son inclusion (consentement) soit en tant que « cas-parodontite » soit en tant que 'Témoin'.

Les prélèvements sont alors réalisés dans le cadre du parcours de soin du patient dans un but de diagnostic ou de dépistage (diabète et troubles de l'hémostase).

Le suivi de la parodontite ne sera pas modifié par le protocole. la réévaluation aura lieu à 3 mois en consultation de routine pour évaluer le résultat du traitement parodontal non chirurgical. Lors de cette consultation, où une nouvelle observation clinique sera réalisée, de nouveaux prélèvements sanguins et gingivaux pourront être obtenus si une intervention de chirurgie buccale était indiquée.

L'étude ne modifiera donc en rien les habitudes du service ni les modalités de prise en charge

**Conclusion :**

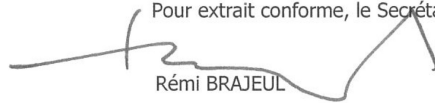
Il s'agit donc d'une étude observationnelle, qui ne relève pas, en l'état, de la loi sur la recherche biomédicale.

**Avis**

Après en avoir délibéré, et à l'unanimité, le comité d'éthique fait savoir qu'il ne soulève aucune objection sous l'angle de l'éthique à l'étude telle que présentée.

Ce projet devra faire l'objet d'une déclaration normale à la CNIL

Pour extrait conforme, le Secrétaire du Comité d'Ethique



Rémi BRAJEUL

### **Résumé de l'objectif de la biocollection OdontoBrest**

La cavité buccale est le lieu de nombreuses affections qui sont principalement d'origine bactérienne. La dent et son parodonte (tissus de soutien) sont les éléments les plus touchés. Au niveau de la dent, l'émail et la dentine représentent les couches superficielles minéralisées entourant la pulpe, tissu non minéralisé, fortement innervé et vascularisé. Le parodonte, soutenant la dent, est constitué par le cément, le ligament parodontal, l'os alvéolaire et la gencive. Le reste de la cavité buccale est tapissé par différents types de muqueuses, parfois spécialisées.

Les principales affections de la cavité buccale sont les caries, les atteintes pulpaires et périapicales et les atteintes parodontales. Elles sont les principales causes de la perte des dents.

Les caries résultent d'un processus de déminéralisation de l'émail et de la dentine aboutissant à la formation d'une cavité. Il se produit alors une réaction inflammatoire pulpaire, en réponse à l'agression bactérienne qui peut être réversible dans un premier temps puis évoluer vers une inflammation irréversible et une nécrose.

De même, les maladies parodontales sont des maladies inflammatoires d'origine infectieuse. Elles sont caractérisées par une destruction irréversible des tissus de soutien de la dent et sont fortement liées à une réponse exacerbée du système immunitaire de l'hôte.

La réaction inflammatoire varie en fonction des individus. Ces variations expliquent en partie les différents types de réactions pulpaires face à un processus carieux ou les différentes formes de maladies parodontales (parodontites chroniques évoluant lentement et parodontites agressives évoluant rapidement et fortement corrélées à une permissivité de l'hôte). Les acteurs, notamment les éléments cellulaires, de cette réaction inflammatoire sont issus du compartiment sanguin et passent la barrière endothéliale pour agir au niveau des tissus pulpaires et parodontaux. Pendant et après ce passage leur phénotype peut changer. De même, des cytokines proinflammatoires peuvent circuler entre ces deux compartiments.

Les maladies parodontales, pulpaires et périapicales entretiennent des relations étroites avec de nombreuses maladies systémiques (athérosclérose, diabète, polyarthrite rhumatoïde), souvent avec des influences bidirectionnelles. Ces interrelations sont souvent liées à l'aspect inflammatoire chronique de ces pathologies et à la circulation constante d'éléments proinflammatoires au niveau du sang.

Notre objectif est d'étudier dans le cadre de différents projets de recherche les éléments du compartiment sanguin et les différents tissus et fluides de la cavité buccale. L'établissement d'une biocollection de tissus et de fluides buccaux et de sang chez un même patient, corrélés aux informations cliniques du patient, est un outil majeur dans la mise en place de ces études.

Les tissus et fluides buccaux nécessaires à la recherche seront récupérés lors d'une intervention chirurgicale (extraction de dent, exérèse de kyste, chirurgie à visé d'assainissement parodontal ou périapical, chirurgie implantaire...) prévue dans le cadre de la prise en charge du patient. Ils représentent des déchets d'intervention. Le sang est prélevé avant, pendant ou après cette intervention, de manière concomitante à un bilan biologique prévu dans la prise en charge du patient. Les informations concernant le patient seront anonymisées et font l'objet d'une déclaration auprès de la CNIL.

L'objectif initial de cette biocollection est de pouvoir réaliser des recherches sur les pathologies de la sphère bucco-dentaire.

## REFERENCES :

1. Pihlstrom, B.L., B.S. Michalowicz, and N.W. Johnson, *Periodontal diseases*. Lancet, 2005. **366**(9499): p. 1809-20.
2. Kornman, K.S., W.V. Giannobile, and G.W. Duff, *Quo vadis: what is the future of periodontics? How will we get there?* Periodontol 2000, 2017. **75**(1): p. 353-371.
3. Hajishengallis, G. and J.M. Korostoff, *Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later*. Periodontol 2000, 2017. **75**(1): p. 116-151.
4. Hajishengallis, G., *Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response*. Trends Immunol, 2014. **35**(1): p. 3-11.
5. Hujoel, P., et al., *Specific infections as the etiology of destructive periodontal disease: a systematic review*. Eur J Oral Sci, 2013. **121**(1): p. 2-6.
6. Hujoel, P., et al., *Historical perspectives on theories of periodontal disease etiology*. Periodontol 2000, 2012. **58**(1): p. 153-60.
7. Loe, H., E. Theilade, and S.B. Jensen, *Experimental Gingivitis in Man*. J Periodontol, 1965. **36**: p. 177-87.
8. Mark Bartold, P. and T.E. Van Dyke, *Host modulation: controlling the inflammation to control the infection*. Periodontol 2000, 2017. **75**(1): p. 317-329.
9. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts*. J Periodontol, 1992. **63**(4 Suppl): p. 322-31.
10. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *Periodontal microbial ecology*. Periodontol 2000, 2005. **38**: p. 135-87.
11. Van Dyke, T.E., *The etiology and pathogenesis of periodontitis revisited*. J Appl Oral Sci, 2009. **17**(1).
12. Klausen, B., H.P. Hougen, and N.E. Fiehn, *Increased periodontal bone loss in temporarily B lymphocyte-deficient rats*. J Periodontal Res, 1989. **24**(6): p. 384-90.
13. Winning, L. and G.J. Linden, *Periodontitis and systemic disease*. BDJ Team, 2015. **2**(10): p. 15163.
14. Kornman, K.S., *Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look*. J Periodontol, 2008. **79**(8 Suppl): p. 1560-8.
15. Cain, D., et al., *Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p. 266-77.
16. Hajishengallis, G., et al., *Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement*. Cell Host Microbe, 2011. **10**(5): p. 497-506.
17. Kornman, K.S. and P.J. Polverini, *Clinical application of genetics to guide prevention and treatment of oral diseases*. Clin Genet, 2014. **86**(1): p. 44-9.
18. Van der Velden, U., *What exactly distinguishes aggressive from chronic periodontitis: is it mainly a difference in the degree of bacterial invasiveness?* Periodontol 2000, 2017. **75**(1): p. 24-44.
19. Armitage, G.C., *Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis*. Periodontol 2000, 2010. **53**: p. 70-88.
20. Socransky, S.S., et al., *Microbial complexes in subgingival plaque*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(2): p. 134-44.
21. Darveau, R.P., G. Hajishengallis, and M.A. Curtis, *Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease*. J Dent Res, 2012. **91**(9): p. 816-20.
22. Hajishengallis, G., et al., *Complement inhibition in pre-clinical models of periodontitis and prospects for clinical application*. Semin Immunol, 2016. **28**(3): p. 285-91.

## Références

23. Han, X., et al., *Porphyromonas gingivalis* infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF-kappaB ligand. *Infect Immun*, 2013. **81**(5): p. 1502-9.
24. Ojcius, D.M., et al., *Profiling of subgingival plaque biofilm microbiota in adolescents after completion of orthodontic therapy*. *Plos One*, 2017. **12**(2): p. e0171550.
25. Zhuang, L.F., et al., *Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues*. *Clin Oral Implants Res*, 2016. **27**(1): p. 13-21.
26. Armitage, G.C., *Development of a classification system for periodontal diseases and conditions*. *Ann Periodontol*, 1999. **4**(1): p. 1-6.
27. Genco, R.J. and W.S. Borgnakke, *Risk factors for periodontal disease*. *Periodontol* 2000, 2013. **62**(1): p. 59-94.
28. Bastiaan, R.J., *The effects of tobacco smoking on periodontal tissues*. *J West Soc Periodontol Periodontol Abstr*, 1979. **27**(4): p. 120-5.
29. Calsina, G., J.M. Ramon, and J.J. Echeverria, *Effects of smoking on periodontal tissues*. *J Clin Periodontol*, 2002. **29**(8): p. 771-6.
30. Kinane, D.F., P.G. Stathopoulou, and P.N. Papapanou, *Periodontal diseases*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 17038.
31. Seymour, G.J., R.N. Powell, and W.I. Davies, *Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: an hypothesis*. *J Clin Periodontol*, 1979. **6**(5): p. 267-77.
32. Page, R.C. and H.E. Schroeder, *Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work*. *Lab Invest*, 1976. **34**(3): p. 235-49.
33. Berglundh, T., M. Donati, and N. Zitzmann, *B cells in periodontitis: friends or enemies?* *Periodontol* 2000, 2007. **45**: p. 51-66.
34. Zouali, M., *The emerging roles of B cells as partners and targets in periodontitis*. *Autoimmunity*, 2017. **50**(1): p. 61-70.
35. Baker, P.J., et al., *B Cell IgD Deletion Prevents Alveolar Bone Loss Following Murine Oral Infection*. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009. **2009**: p. 864359.
36. Oliver-Bell, J., et al., *Periodontitis in the absence of B cells and specific anti-bacterial antibody*. *Mol Oral Microbiol*, 2015. **30**(2): p. 160-9.
37. Harada, Y., et al., *Effect of adoptive transfer of antigen-specific B cells on periodontal bone resorption*. *J Periodontal Res*, 2006. **41**(2): p. 101-7.
38. Graves, D., *Cytokines that promote periodontal tissue destruction*. *J Periodontol*, 2008. **79**(8 Suppl): p. 1585-91.
39. Mayer, Y., A. Balbir-Gurman, and E.E. Machtei, *Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy and periodontal parameters in patients with rheumatoid arthritis*. *J Periodontol*, 2009. **80**(9): p. 1414-20.
40. Pers, J.O., et al., *Anti-TNF-alpha immunotherapy is associated with increased gingival inflammation without clinical attachment loss in subjects with rheumatoid arthritis*. *J Periodontol*, 2008. **79**(9): p. 1645-51.
41. Armitage, G.C., *Classifying periodontal diseases--a long-standing dilemma*. *Periodontol* 2000, 2002. **30**: p. 9-23.
42. Armitage, G.C., *Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases*. *Periodontol* 2000, 2004. **34**: p. 9-21.
43. Albandar, J.M., *Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria*. *Periodontol* 2000, 2014. **65**(1): p. 13-26.
44. Albandar, J.M., *Aggressive and acute periodontal diseases*. *Periodontol* 2000, 2014. **65**(1): p. 7-12.

## Références

45. Khocht, A. and J.M. Albandar, *Aggressive forms of periodontitis secondary to systemic disorders*. Periodontol 2000, 2014. **65**(1): p. 134-48.
46. Smith, M., G.J. Seymour, and M.P. Cullinan, *Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis*. Periodontol 2000, 2010. **53**: p. 45-54.
47. Ford, P.J., J. Gamonal, and G.J. Seymour, *Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis*. Periodontol 2000, 2010. **53**: p. 111-23.
48. Page, R.C. and P.I. Eke, *Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis*. J Periodontol, 2007. **78**(7 Suppl): p. 1387-99.
49. Eke, P.I., et al., *Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis*. J Periodontol, 2012. **83**(12): p. 1449-54.
50. Tan, H., K.G. Peres, and M.A. Peres, *Retention of Teeth and Oral Health–Related Quality of Life*. Journal of Dental Research, 2016. **95**(12): p. 1350-1357.
51. Papapanou, P.N. and C. Susin, *Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both?* Periodontol 2000, 2017. **75**(1): p. 45-51.
52. Kim, J. and S. Amar, *Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship*. Odontology, 2006. **94**(1): p. 10-21.
53. Nazir, M.A., *Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention*. Int J Health Sci (Qassim), 2017. **11**(2): p. 72-80.
54. Chauncey, H.H., R.L. Glass, and J.E. Alman, *Dental caries. Principal cause of tooth extraction in a sample of US male adults*. Caries Res, 1989. **23**(3): p. 200-5.
55. Montandon, A., E. Zuza, and B.E. Toledo, *Prevalence and reasons for tooth loss in a sample from a dental clinic in Brazil*. Int J Dent, 2012. **2012**: p. 719750.
56. Sanya, B.O., P.M. Ng'ang'a, and R.N. Ng'ang'a, *Causes and pattern of missing permanent teeth among Kenyans*. East Afr Med J, 2004. **81**(6): p. 322-5.
57. Kassebaum, N.J., et al., *Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis*. J Dent Res, 2014. **93**(7 Suppl): p. 20S-28S.
58. Albandar, J.M., L.J. Brown, and H. Loe, *Dental caries and tooth loss in adolescents with early-onset periodontitis*. J Periodontol, 1996. **67**(10): p. 960-7.
59. Kassebaum, N.J., et al., *Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010*. Journal of Dental Research, 2014. **93**(11): p. 1045-1053.
60. Bourgeois, D., P. Bouchard, and C. Mattout, *Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003*. J Periodontal Res, 2007. **42**(3): p. 219-27.
61. Albandar, J.M., *Periodontal disease is prevalent among adults in France*. J Evid Based Dent Pract, 2008. **8**(2): p. 89-90.
62. Eke, P.I., et al., *Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012*. Journal of Periodontology, 2015. **86**(5): p. 611-622.
63. Chandra, A., et al., *Epidemiology of periodontal diseases in Indian population since last decade*. J Int Soc Prev Community Dent, 2016. **6**(2): p. 91-6.
64. Borrell, L.N. and N.D. Crawford, *Socioeconomic position indicators and periodontitis: examining the evidence*. Periodontol 2000, 2012. **58**(1): p. 69-83.
65. Miller, N.A., et al., *An analysis of the CPITN periodontal treatment needs in France*. Community Dent Health, 1987. **4**(4): p. 415-23.
66. Papapanou, P.N., *Epidemiology of periodontal diseases: an update*. J Int Acad Periodontol, 1999. **1**(4): p. 110-6.
67. Dye, B.A., *Global periodontal disease epidemiology*. Periodontol 2000, 2012. **58**(1): p. 10-25.
68. Eke, P.I., et al., *Advances in surveillance of periodontitis: the Centers for Disease Control and Prevention periodontal disease surveillance project*. J Periodontol, 2012. **83**(11): p. 1337-42.

## Références

69. Hugoson, A. and O. Norderyd, *Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years?* J Clin Periodontol, 2008. **35**(8 Suppl): p. 338-45.
70. Arigbede, A.O., B.O. Babatope, and M.K. Bamidele, *Periodontitis and systemic diseases: A literature review.* J Indian Soc Periodontol, 2012. **16**(4): p. 487-91.
71. Page, R.C., *The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm.* Ann Periodontol, 1998. **3**(1): p. 108-20.
72. Garg, P., et al., *Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease.* Plos One, 2016. **11**(3): p. e0151081.
73. Calderaro, D.C., et al., *Is chronic periodontitis premature in systemic lupus erythematosus patients?* Clin Rheumatol, 2017. **36**(3): p. 713-718.
74. Corrêa, J.D., et al., *Subgingival microbiota dysbiosis in systemic lupus erythematosus: association with periodontal status.* Microbiome, 2017. **5**(1).
75. Eriksson, K., et al., *Prevalence of Periodontitis in Patients with Established Rheumatoid Arthritis: A Swedish Population Based Case-Control Study.* PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155956.
76. Zhu, M., et al., *B cells promote obesity-associated periodontitis and oral pathogen-associated inflammation.* J Leukoc Biol, 2014. **96**(2): p. 349-57.
77. Allende, M.L., et al., *SIP1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood.* The Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(5): p. 1113-1124.
78. Aoki, M., et al., *Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential.* Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 8606878.
79. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines.* Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 123-8.
80. Allam, J.P. and N. Novak, *Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2014. **14**(6): p. 564-9.
81. Aznar, M.A., et al., *Intratumoral Delivery of Immunotherapy-Act Locally, Think Globally.* J Immunol, 2017. **198**(1): p. 31-39.
82. Mulder, W.J.M. and S. Gnjatic, *Cancer Immunotherapy: From local to global.* Nat Nanotechnol, 2017. **12**(9): p. 840-841.
83. Dupuis-Girod, S., et al., *Effect of Bevacizumab Nasal Spray on Epistaxis Duration in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: A Randomized Clinical Trial.* JAMA, 2016. **316**(9): p. 934-42.
84. Whitehead, K.J., et al., *Effect of Topical Intranasal Therapy on Epistaxis Frequency in Patients With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: A Randomized Clinical Trial.* JAMA, 2016. **316**(9): p. 943-51.
85. Sirotti, S., et al., *Personalized medicine in rheumatology: the paradigm of serum autoantibodies.* Autoimmunity Highlights, 2017. **8**(1).
86. Korte, D.L. and J. Kinney, *Personalized medicine: an update of salivary biomarkers for periodontal diseases.* Periodontol 2000, 2016. **70**(1): p. 26-37.
87. Mackler, B.F., et al., *Blastogenesis and lymphokine synthesis by T and B lymphocytes from patients with periodontal disease.* Infect Immun, 1974. **10**(4): p. 844-50.
88. Loe, H., et al., *Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development.* J Periodontal Res, 1967. **2**(4): p. 282-9.
89. Marsh, P.D. and D.J. Bradshaw, *Dental plaque as a biofilm.* J Ind Microbiol, 1995. **15**(3): p. 169-75.
90. Scheie, A.A., *Mechanisms of dental plaque formation.* Adv Dent Res, 1994. **8**(2): p. 246-53.



## Références

91. Marsh, P.D., *Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease*. Adv Dent Res, 1994. **8**(2): p. 263-71.
92. Nisengard, R.J., *The role of immunology in periodontal disease*. J Periodontol, 1977. **48**(9): p. 505-16.
93. Mackler, B.F., et al., *Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease*. J Periodontal Res, 1977. **12**(1): p. 37-45.
94. Seymour, G.J., H.M. Dockrell, and J.S. Greenspan, *Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils and periodontal disease*. Clin Exp Immunol, 1978. **32**(1): p. 169-78.
95. Seymour, G.J., R.N. Powell, and W.I. Davies, *The immunopathogenesis of progressive chronic inflammatory periodontal disease*. J Oral Pathol, 1979. **8**(5): p. 249-65.
96. Kornman, K.S., R.C. Page, and M.S. Tonetti, *The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players*. Periodontol 2000, 1997. **14**: p. 33-53.
97. Page, R.C. and K.S. Kornman, *The pathogenesis of human periodontitis: an introduction*. Periodontol 2000, 1997. **14**: p. 9-11.
98. Page, R.C., et al., *Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions*. Periodontol 2000, 1997. **14**: p. 216-48.
99. Hajishengallis, G., R.P. Darveau, and M.A. Curtis, *The keystone-pathogen hypothesis*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(10): p. 717-25.
100. Kilian, M., et al., *The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals*. Br Dent J, 2016. **221**(10): p. 657-666.
101. Costerton, J.W., *Introduction to biofilm*. Int J Antimicrob Agents, 1999. **11**(3-4): p. 217-21; discussion 237-9.
102. Abusleme, L., et al., *The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation*. ISME J, 2013. **7**(5): p. 1016-25.
103. Meuric, V., et al., *Signature of Microbial Dysbiosis in Periodontitis*. Appl Environ Microbiol, 2017. **83**(14).
104. Adams, S.E., et al., *A randomised clinical study to determine the effect of a toothpaste containing enzymes and proteins on plaque oral microbiome ecology*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43344.
105. Zarco, M.F., T.J. Vess, and G.S. Ginsburg, *The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine*. Oral Dis, 2012. **18**(2): p. 109-20.
106. Dewhirst, F.E., et al., *The human oral microbiome*. J Bacteriol, 2010. **192**(19): p. 5002-17.
107. Larsen, T. and N.E. Fiehn, *Dental biofilm infections - an update*. APMIS, 2017. **125**(4): p. 376-384.
108. Jakubovics, N.S. and P.E. Kolenbrander, *The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms*. Oral Diseases, 2010. **16**(8): p. 729-739.
109. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
110. Gholizadeh, P., et al., *Role of oral microbiome on oral cancers, a review*. Biomed Pharmacother, 2016. **84**: p. 552-558.
111. Ebersole, J.L., et al., *The periodontal war: microbes and immunity*. Periodontol 2000, 2017. **75**(1): p. 52-115.

## Références

112. Marsh, P.D. and D.A. Devine, *How is the development of dental biofilms influenced by the host?* J Clin Periodontol, 2011. **38 Suppl 11**: p. 28-35.
113. Marsh, P.D. and E. Zaura, *Dental biofilm: ecological interactions in health and disease.* J Clin Periodontol, 2017. **44 Suppl 18**: p. S12-S22.
114. Kolenbrander, P.E., et al., *Communication among oral bacteria.* Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(3): p. 486-505, table of contents.
115. Olsen, I., *Modification of phage for increased antibacterial effect towards dental biofilm.* J Oral Microbiol, 2016. **8**: p. 33089.
116. Szafranski, S.P., A. Winkel, and M. Stiesch, *The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms.* J Biotechnol, 2017. **250**: p. 29-44.
117. Darveau, R.P., A. Tanner, and R.C. Page, *The microbial challenge in periodontitis.* Periodontol 2000, 1997. **14**: p. 12-32.
118. Stoodley, P., et al., *The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow.* Environ Microbiol, 1999. **1**(5): p. 447-55.
119. Marsh, P.D., *Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style.* J Clin Periodontol, 2005. **32 Suppl 6**: p. 7-15.
120. Amar, S., et al., *A new mathematical model of bacterial interactions in two-species oral biofilms.* Plos One, 2017. **12**(3): p. e0173153.
121. Olczak, T., et al., *Iron and heme utilization in Porphyromonas gingivalis.* FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(1): p. 119-44.
122. Olsen, I., J.D. Lambris, and G. Hajishengallis, *Porphyromonas gingivalis disturbs host-commensal homeostasis by changing complement function.* J Oral Microbiol, 2017. **9**(1): p. 1340085.
123. Moutsopoulos, N.M., et al., *Porphyromonas gingivalis promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis.* J Autoimmun, 2012. **39**(4): p. 294-303.
124. Kassem, A., et al., *Porphyromonas gingivalis Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF-kappaB Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts.* J Biol Chem, 2015. **290**(33): p. 20147-58.
125. Olsen, I., M.A. Taubman, and S.K. Singhrao, *Porphyromonas gingivalis suppresses adaptive immunity in periodontitis, atherosclerosis, and Alzheimer's disease.* J Oral Microbiol, 2016. **8**: p. 33029.
126. Mysak, J., et al., *Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview.* J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 476068.
127. Olsen, I. and G. Hajishengallis, *Major neutrophil functions subverted by Porphyromonas gingivalis.* J Oral Microbiol, 2016. **8**: p. 30936.
128. Hovingh, E.S., B. van den Broek, and I. Jongerius, *Hijacking Complement Regulatory Proteins for Bacterial Immune Evasion.* Front Microbiol, 2016. **7**: p. 2004.
129. Blom, A.M., T. Hallstrom, and K. Riesbeck, *Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond.* Mol Immunol, 2009. **46**(14): p. 2808-17.
130. Toapanta, F.R. and T.M. Ross, *Complement-mediated activation of the adaptive immune responses: role of C3d in linking the innate and adaptive immunity.* Immunol Res, 2006. **36**(1-3): p. 197-210.
131. Tam, V., et al., *The RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of Porphyromonas gingivalis Inactivate the Th2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5.* Infect Immun, 2009. **77**(4): p. 1451-8.
132. Khalaf, H. and T. Bengtsson, *Altered T-cell responses by the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis.* PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45192.

## Références

133. Bainbridge, B.W. and R.P. Darveau, *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand*, 2001. **59**(3): p. 131-8.
134. Lin, M., et al., *Different engagement of TLR2 and TLR4 in Porphyromonas gingivalis* vs. *ligature-induced periodontal bone loss*. *Braz Oral Res*, 2017. **31**: p. e63.
135. Zhou, L., et al., *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides affect gingival stem/progenitor cells attributes through NF-kappaB, but not Wnt/beta-catenin, pathway. *J Clin Periodontol*, 2017. **44**(11): p. 1112-1122.
136. Chen, Z., et al., *IL-1R/TLR2 through MyD88 Divergently Modulates Osteoclastogenesis through Regulation of Nuclear Factor of Activated T Cells c1 (NFATc1) and B Lymphocyte-induced Maturation Protein-1 (Blimp1)*. *Journal of Biological Chemistry*, 2015. **290**(50): p. 30163-30174.
137. Groeger, S., et al., *Porphyromonas gingivalis* activates NFkappaB and MAPK pathways in human oral epithelial cells. *BMC Immunol*, 2017. **18**(1): p. 1.
138. Dar, H.Y., et al., *Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018. **23**: p. 464-492.
139. Choi, Y., et al., *Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(7): p. 2179-88.
140. Arron, J.R. and Y. Choi, *Bone versus immune system*. *Nature*, 2000. **408**(6812): p. 535-6.
141. Dougall, W.C., et al., *RANK is essential for osteoclast and lymph node development*. *Genes Dev*, 1999. **13**(18): p. 2412-24.
142. Kong, Y.Y., et al., *OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis*. *Nature*, 1999. **397**(6717): p. 315-23.
143. Hess, E., et al., *RANKL induces organized lymph node growth by stromal cell proliferation*. *J Immunol*, 2012. **188**(3): p. 1245-54.
144. Mueller, C.G. and E. Hess, *Emerging Functions of RANKL in Lymphoid Tissues*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 261.
145. Walsh, M.C. and Y. Choi, *Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 511.
146. Kostenuik, P.J., *Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength*. *Curr Opin Pharmacol*, 2005. **5**(6): p. 618-25.
147. Kawai, T., et al., *B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(3): p. 987-98.
148. Boyce, B.F. and L. Xing, *The RANKL/RANK/OPG pathway*. *Curr Osteoporos Rep*, 2007. **5**(3): p. 98-104.
149. Kohli, S. and V. Kohli, *Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications*. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2011. **15**(3).
150. Blair, J.M., Y. Zheng, and C.R. Dunstan, *RANK ligand*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(6): p. 1077-81.
151. Remuzgo-Martinez, S., et al., *Expression of osteoprotegerin and its ligands, RANKL and TRAIL, in rheumatoid arthritis*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 29713.
152. Suzuki, J., et al., *Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. **314**(4): p. 1021-1027.
153. Ohshiba, T., et al., *Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(8): p. 1318-26.

## Références

154. Lynch, C.C., et al., *MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(5): p. 485-96.
155. Kanzaki, H., et al., *Soluble RANKL Cleaved from Activated Lymphocytes by TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme Contributes to Osteoclastogenesis in Periodontitis*. *J Immunol*, 2016. **197**(10): p. 3871-3883.
156. Mahanonda, R., et al., *Human Memory B Cells in Healthy Gingiva, Gingivitis, and Periodontitis*. *J Immunol*, 2016. **197**(3): p. 715-25.
157. Ota, Y., et al., *Generation mechanism of RANKL(+) effector memory B cells: relevance to the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2016. **18**: p. 67.
158. Hakozaki, A., et al., *Receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand induces ectodomain shedding of RANK in murine RAW264.7 macrophages*. *J Immunol*, 2010. **184**(5): p. 2442-8.
159. Theoleyre, S., et al., *The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. **15**(6): p. 457-75.
160. Emery, J.G., et al., *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(23): p. 14363-7.
161. Pritzker, L.B., M. Scatena, and C.M. Giachelli, *The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(6): p. 2834-41.
162. Schoppet, M., et al., *Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent*. *J Cell Biochem*, 2007. **100**(6): p. 1430-9.
163. Yun, T.J., et al., *OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40*. *J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 6113-21.
164. Bostanci, N., et al., *Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases*. *J Periodontal Res*, 2007. **42**(4): p. 287-93.
165. Sojod, B., et al., *RANK/RANKL/OPG Signaling Implication in Periodontitis: New Evidence from a RANK Transgenic Mouse Model*. *Front Physiol*, 2017. **8**: p. 338.
166. Hajishengallis, E. and G. Hajishengallis, *Neutrophil homeostasis and periodontal health in children and adults*. *J Dent Res*, 2014. **93**(3): p. 231-7.
167. Bailleul-Forestier, I., et al., *Generalized periodontitis associated with Chediak-Higashi syndrome*. *J Periodontol*, 2008. **79**(7): p. 1263-70.
168. Maekawa, T., et al., *Porphyromonas gingivalis manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis*. *Cell Host Microbe*, 2014. **15**(6): p. 768-78.
169. Chakravarti, A., et al., *Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption*. *Blood*, 2009. **114**(8): p. 1633-44.
170. Holliday, L.S., et al., *Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(35): p. 22053-8.
171. Lee, W., et al., *Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis*. *J Periodontal Res*, 1995. **30**(1): p. 23-33.
172. Scapini, P. and M.A. Cassatella, *Social networking of human neutrophils within the immune system*. *Blood*, 2014. **124**(5): p. 710-9.
173. Ling, M.R., I.L. Chapple, and J.B. Matthews, *Peripheral blood neutrophil cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis*. *Innate Immun*, 2015. **21**(7): p. 714-25.

## Références

174. Moutsopoulos, N.M., M.S. Lionakis, and G. Hajishengallis, *Inborn errors in immunity: unique natural models to dissect oral immunity*. J Dent Res, 2015. **94**(6): p. 753-8.
175. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-31.
176. Pelletier, M., et al., *Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells*. Blood, 2010. **115**(2): p. 335-43.
177. Huard, B., et al., *APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2887-95.
178. Scapini, P., et al., *Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases*. Blood, 2005. **105**(2): p. 830-7.
179. Thorbert-Mros, S., L. Larsson, and T. Berglundh, *Cellular composition of long-standing gingivitis and periodontitis lesions*. J Periodontal Res, 2015. **50**(4): p. 535-43.
180. Allam, J.P., et al., *IL-23-producing CD68(+) macrophage-like cells predominate within an IL-17-polarized infiltrate in chronic periodontitis lesions*. J Clin Periodontol, 2011. **38**(10): p. 879-86.
181. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
182. Tabas, I. and C.K. Glass, *Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities*. Science, 2013. **339**(6116): p. 166-72.
183. Korns, D., et al., *Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation*. Front Immunol, 2011. **2**: p. 57.
184. Mills, C.D., *M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(6): p. 463-88.
185. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1504-8.
186. Lam, R.S., et al., *Macrophage depletion abates Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone resorption in mice*. J Immunol, 2014. **193**(5): p. 2349-62.
187. Alnaeeli, M., et al., *Dendritic cells at the osteo-immune interface: implications for inflammation-induced bone loss*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(6): p. 775-80.
188. Kajiya, M., et al., *Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease*. J Oral Microbiol, 2010. **2**.
189. Zhang, P., et al., *TLR2-dependent modulation of osteoclastogenesis by Porphyromonas gingivalis through differential induction of NFATc1 and NF-kappaB*. J Biol Chem, 2011. **286**(27): p. 24159-69.
190. Cirrincione, C., et al., *Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis*. J Periodontol, 2002. **73**(1): p. 45-52.
191. Song, L., et al., *The function of dendritic cells in modulating the host response*. Mol Oral Microbiol, 2017.
192. Wilensky, A., et al., *Dendritic cells and their role in periodontal disease*. Oral Dis, 2014. **20**(2): p. 119-26.
193. Segura, E., et al., *Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 336-48.
194. McKenna, K., A.S. Beignon, and N. Bhardwaj, *Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity*. J Virol, 2005. **79**(1): p. 17-27.
195. Swiecki, M. and M. Colonna, *The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(8): p. 471-85.

## Références

196. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1219-26.
197. Veglia, F. and D.I. Gabrilovich, *Dendritic cells in cancer: the role revisited*. Curr Opin Immunol, 2017. **45**: p. 43-51.
198. Reibel, J., et al., *Pattern of distribution of T lymphocytes, Langerhans cells and HLA-DR bearing cells in normal human oral mucosa*. Scand J Dent Res, 1985. **93**(6): p. 513-21.
199. Allam, J.P., et al., *Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy?* Allergy, 2008. **63**(6): p. 720-7.
200. Jotwani, R., et al., *Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4693-700.
201. Arizon, M., et al., *Langerhans cells down-regulate inflammation-driven alveolar bone loss*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(18): p. 7043-8.
202. Cutler, C.W. and R. Jotwani, *Dendritic cells at the oral mucosal interface*. J Dent Res, 2006. **85**(8): p. 678-89.
203. Bittner-Eddy, P.D., et al., *Mucosal Langerhans Cells Promote Differentiation of Th17 Cells in a Murine Model of Periodontitis but Are Not Required for Porphyromonas gingivalis-Driven Alveolar Bone Destruction*. J Immunol, 2016. **197**(4): p. 1435-46.
204. Xiao, W., et al., *FOXO1 deletion reduces dendritic cell function and enhances susceptibility to periodontitis*. Am J Pathol, 2015. **185**(4): p. 1085-93.
205. Dutzan, N., et al., *Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis*. J Periodontol, 2009. **80**(2): p. 290-6.
206. Stashenko, P., et al., *Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by Porphyromonas gingivalis*. Am J Pathol, 2007. **170**(1): p. 203-13.
207. Coats, S.R., et al., *Human Toll-like receptor 4 responses to P. gingivalis are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities*. Cell Microbiol, 2009. **11**(11): p. 1587-99.
208. Cury, P.R., et al., *Altered phenotype and function of dendritic cells in individuals with chronic periodontitis*. Arch Oral Biol, 2013. **58**(9): p. 1208-16.
209. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
210. Su, H., et al., *Differential roles of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide and Escherichia coli lipopolysaccharide in maturation and antigen-presenting functions of dendritic cells*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. **19**(13): p. 2482-92.
211. Myneni, S.R., et al., *TLR2 signaling and Th2 responses drive Tannerella forsythia-induced periodontal bone loss*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 501-9.
212. Na, H., M. Cho, and Y. Chung, *Regulation of Th2 Cell Immunity by Dendritic Cells*. Immune Netw, 2016. **16**(1): p. 1-12.
213. Craxton, A., et al., *Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4464-71.
214. Jegu, G., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6*. Immunity, 2003. **19**(2): p. 225-34.
215. Garcia-Marquez, M., A. Shimabukuro-Vornhagen, and M. von Bergwelt-Baildon, *Complex interactions between B cells and dendritic cells*. Blood, 2013. **121**(12): p. 2367-8.
216. Wykes, M., et al., *Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1313-9.

## Références

217. Wykes, M. and G. MacPherson, *Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 1-3.
218. Gemmell, E., K. Yamazaki, and G.J. Seymour, *The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity*. Periodontol 2000, 2007. **43**: p. 14-40.
219. Li, Y., et al., *B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3839-48.
220. Peterson, R.A., *Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression*. Toxicologic Pathology, 2012. **40**(2): p. 186-204.
221. Arun, K.V., A. Talwar, and T.S. Kumar, *T-helper cells in the etiopathogenesis of periodontal disease: A mini review*. J Indian Soc Periodontol, 2011. **15**(1): p. 4-10.
222. Golubovskaya, V. and L. Wu, *Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy*. Cancers (Basel), 2016. **8**(3).
223. Schiott, A., et al., *CD27- CD4+ memory T cells define a differentiated memory population at both the functional and transcriptional levels*. Immunology, 2004. **113**(3): p. 363-70.
224. Dutzan, N., et al., *Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier*. Mucosal Immunol, 2016. **9**(5): p. 1163-72.
225. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *How diverse--CD4 effector T cells and their functions*. J Mol Cell Biol, 2009. **1**(1): p. 20-36.
226. Webb, L.M.C. and M.A. Linterman, *Signals that drive T follicular helper cell formation*. Immunology, 2017. **152**(2): p. 185-194.
227. Miossec, P., *Dynamic interactions between T cells and dendritic cells and their derived cytokines/chemokines in the rheumatoid synovium*. Arthritis Res Ther, 2008. **10 Suppl 1**: p. S2.
228. Crotty, S., *T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease*. Immunity, 2014. **41**(4): p. 529-42.
229. Talwar, A., et al., *Plasticity of T helper cell subsets: Implications in periodontal disease*. J Indian Soc Periodontol, 2013. **17**(3): p. 288-91.
230. Damsker, J.M., A.M. Hansen, and R.R. Caspi, *Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 211-21.
231. Walker, J.A. and A.N.J. McKenzie, *TH2 cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2017.
232. Mitsdoerffer, M., et al., *Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(32): p. 14292-7.
233. Jones, G.W., D.G. Hill, and S.A. Jones, *Understanding Immune Cells in Tertiary Lymphoid Organ Development: It Is All Starting to Come Together*. Frontiers in Immunology, 2016. **7**.
234. Cardoso, C.R., et al., *Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(1): p. 1-6.
235. Kikuta, J., et al., *Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 866-73.
236. Gao, L., et al., *Detection of Th17/Treg cells and related factors in gingival tissues and peripheral blood of rats with experimental periodontitis*. Iran J Basic Med Sci, 2017. **20**(3): p. 294-300.
237. Xu, A., et al., *TGF-beta-Induced Regulatory T Cells Directly Suppress B Cell Responses through a Noncytotoxic Mechanism*. J Immunol, 2016. **196**(9): p. 3631-41.
238. Sabarish, R., S.R. Rao, and V. Lavu, *Natural T Regulatory Cells (n Treg) in the Peripheral Blood of Healthy Subjects and Subjects with Chronic Periodontitis - A Pilot Study*. J Clin Diagn Res, 2016. **10**(3): p. ZC36-9.

## Références

239. Chien, C.H. and B.L. Chiang, *Regulatory T cells induced by B cells: a novel subpopulation of regulatory T cells*. J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 86.
240. Zheng, M., et al., *Interaction of CD5 and CD72 is involved in regulatory T and B cell homeostasis*. Immunol Invest, 2014. **43**(7): p. 705-16.
241. Nakajima, T., et al., *Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues*. J Dent Res, 2005. **84**(7): p. 639-43.
242. Faustino, L., et al., *Regulatory T cells accumulate in the lung allergic inflammation and efficiently suppress T-cell proliferation but not Th2 cytokine production*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 721817.
243. Araujo-Pires, A.C., et al., *IL-4/CCL22/CCR4 axis controls regulatory T-cell migration that suppresses inflammatory bone loss in murine experimental periodontitis*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(3): p. 412-22.
244. Garlet, G.P., C.S. Sfeir, and S.R. Little, *Restoring host-microbe homeostasis via selective chemoattraction of Tregs*. J Dent Res, 2014. **93**(9): p. 834-9.
245. Chinen, T., et al., *A critical role for regulatory T cell-mediated control of inflammation in the absence of commensal microbiota*. J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2323-30.
246. Craft, J.E., *Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(6): p. 337-47.
247. Diaz-Zuniga, J., et al., *Increased levels of the T-helper 22-associated cytokine (interleukin-22) and transcription factor (aryl hydrocarbon receptor) in patients with periodontitis are associated with osteoclast resorptive activity and severity of the disease*. J Periodontal Res, 2017. **52**(5): p. 893-902.
248. Diaz-Zuniga, J., et al., *Differential human Th22-lymphocyte response triggered by Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotypes*. Arch Oral Biol, 2017. **78**: p. 26-33.
249. Gray, C.M., et al., *Antibody and T Cell Responses to Fusobacterium nucleatum and Treponema denticola in Health and Chronic Periodontitis*. PLoS ONE, 2013. **8**(1): p. e53703.
250. Araujo-Pires, A.C., et al., *Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status*. Journal of Applied Oral Science, 2014. **22**(4): p. 336-346.
251. Cifcibasi, E., et al., *The role of activated cytotoxic T cells in etiopathogenesis of periodontal disease: does it harm or does it heal?* Sci Rep, 2015. **5**: p. 9262.
252. Gonzales, J.R., *T- and B-cell subsets in periodontitis*. Periodontol 2000, 2015. **69**(1): p. 181-200.
253. Teng, Y.T., *Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 2--T-cell-mediated immunity in the periodontium*. J Dent Res, 2006. **85**(3): p. 209-19.
254. Ebersole, J.L., et al., *Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host*. Periodontol 2000, 2013. **62**(1): p. 163-202.
255. Cardoso, E.M. and F.A. Arosa, *CD8+ T Cells in Chronic Periodontitis: Roles and Rules*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 145.
256. Buchwald, Z.S., et al., *Osteoclast activated FoxP3+ CD8+ T-cells suppress bone resorption in vitro*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38199.
257. Fuertes Marraco, S.A., et al., *Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 310.
258. Kiesel, J.R., Z.S. Buchwald, and R. Aurora, *Cross-presentation by osteoclasts induces FoxP3 in CD8+ T cells*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5477-87.



## Références

259. Pacifici, R., *Role of T cells in the modulation of PTH action: physiological and clinical significance*. Endocrine, 2013. **44**(3): p. 576-82.
260. Arosa, F.A., et al., *Divide, Conquer, and Sense: CD8+CD28- T Cells in Perspective*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 665.
261. Artese, L., et al., *Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate in aggressive and chronic periodontitis: a comparative study*. Clin Oral Investig, 2011. **15**(2): p. 233-40.
262. Qin, X., et al., *Increased Innate Lymphoid Cells in Periodontal Tissue of the Murine Model of Periodontitis: The Role of AMP-Activated Protein Kinase and Relevance for the Human Condition*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 922.
263. Parisi, L., et al., *Natural Killer Cells in the Orchestration of Chronic Inflammatory Diseases*. J Immunol Res, 2017. **2017**: p. 4218254.
264. Wilensky, A., S. Chaushu, and L. Shapira, *The role of natural killer cells in periodontitis*. Periodontol 2000, 2015. **69**(1): p. 128-41.
265. Lundqvist, C., et al., *Cytokine profile and ultrastructure of intraepithelial gamma delta T cells in chronically inflamed human gingiva suggest a cytotoxic effector function*. J Immunol, 1994. **153**(5): p. 2302-12.
266. Lundqvist, C., S. Hammarstrom, and M.L. Hammarstrom, *Intraepithelial lymphocytes expressing TCR gamma delta in human gingival tissues*. Adv Exp Med Biol, 1995. **371B**: p. 1097-102.
267. Kawahara, K., et al., *Immunohistochemical study of gamma delta T cells in human gingival tissues*. J Periodontol, 1995. **66**(9): p. 775-9.
268. Nagai, A., et al., *Abnormal proportion of gamma delta T cells in peripheral blood is frequently detected in patients with periodontal disease*. J Periodontol, 1993. **64**(10): p. 963-7.
269. Gemmell, E. and G.J. Seymour, *Gamma delta T lymphocytes in human periodontal disease tissue*. J Periodontol, 1995. **66**(9): p. 780-5.
270. Ito, Y., et al., *Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(8): p. 2294-303.
271. Okamoto, K., et al., *Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems*. Physiol Rev, 2017. **97**(4): p. 1295-1349.
272. Youinou, P., *B cell conducts the lymphocyte orchestra*. J Autoimmun, 2007. **28**(2-3): p. 143-51.
273. Parra, D., et al., *Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(4): p. 525-36.
274. Zamboni, D.S., et al., *Could a B-1 Cell Derived Phagocyte “Be One” of the Peritoneal Macrophages during LPS-Driven Inflammation?* PLoS ONE, 2012. **7**(3).
275. Pugliese, L.S., et al., *B-1 lymphocytes differentiate into functional osteoclast-like cells*. Immunobiology, 2012. **217**(3): p. 336-44.
276. Lee, J., J.H. Sim, and I.J. Kim, *Peripheral immature B cells: modulators of autoimmunity*. Int J Rheum Dis, 2015. **18**(2): p. 200-7.
277. Perlot, T. and J.M. Penninger, *Development and function of murine B cells lacking RANK*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1201-5.
278. Weitzmann, M.N., *Bone and the Immune System*. Toxicol Pathol, 2017. **45**(7): p. 911-924.
279. Hua, Z. and B. Hou, *TLR signaling in B-cell development and activation*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(2): p. 103-6.

## Références

280. Guyodo, H., et al., *Colocalization of Porphyromonas gingivalis with CD4+ T cells in periodontal disease*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **64**(2): p. 175-83.
281. Nakajima, T., et al., *CXCL13 expression and follicular dendritic cells in relation to B-cell infiltration in periodontal disease tissues*. J Periodontal Res, 2008. **43**(6): p. 635-41.
282. Yamazaki, K., et al., *Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease*. J Periodontal Res, 1993. **28**(5): p. 324-34.
283. Tanaka, A., et al., *Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in plasma cells containing Russell's bodies in periodontitis*. J Oral Pathol, 1984. **13**(2): p. 105-10.
284. Joachim, F., et al., *The plasma cell at the advancing front of the lesion in chronic periodontitis*. J Periodontal Res, 1990. **25**(1): p. 49-59.
285. Modeer, T., et al., *Subpopulations of lymphocytes in connective tissue from adolescents with periodontal disease*. Acta Odontol Scand, 1990. **48**(3): p. 153-9.
286. Johnson, R.J., et al., *Immunopathology of periodontal disease. I. Immunologic profiles in periodontitis and juvenile periodontitis*. J Periodontol, 1980. **51**(12): p. 705-12.
287. Carvel, R.I. and R.F. Carr, *Clinico-pathologic correlation of 385 lesions of marginal destructive periodontitis*. J Periodontol, 1982. **53**(5): p. 328-33.
288. Younes, R., et al., *Pertinent cell population to characterize periodontal disease*. Tissue Cell, 2009. **41**(2): p. 141-50.
289. Reinhardt, R.A., et al., *In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites*. J Periodontol, 1988. **59**(10): p. 656-70.
290. Johannessen, A.C., et al., *Variation in the composition of gingival inflammatory cell infiltrates*. J Clin Periodontol, 1990. **17**(5): p. 298-305.
291. Mallison, S.M., 3rd, et al., *Accumulation of plasma cells in inflamed sites: effects of antigen, nonspecific microbial activators, and chronic inflammation*. Infect Immun, 1991. **59**(11): p. 4019-25.
292. Gurses, N., et al., *Immunohistochemical characterization of lymphocyte subsets in chronic adult periodontitis*. J Nihon Univ Sch Dent, 1996. **38**(2): p. 94-101.
293. Gemmell, E. and G.J. Seymour, *Phenotypic analysis of B-cells extracted from human periodontal disease tissue*. Oral Microbiol Immunol, 1991. **6**(6): p. 356-62.
294. Afar, B., D. Engel, and E.A. Clark, *Activated lymphocyte subsets in adult periodontitis*. J Periodontal Res, 1992. **27**(2): p. 126-33.
295. Sugawara, M., et al., *Detection of, and anti-collagen antibody produced by, CD5-positive B cells in inflamed gingival tissues*. J Periodontal Res, 1992. **27**(5): p. 489-98.
296. Aramaki, M., et al., *Presence of activated B-1 cells in chronic inflamed gingival tissue*. J Clin Immunol, 1998. **18**(6): p. 421-9.
297. Berglundh, T., et al., *The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis*. J Clin Periodontol, 2002. **29**(4): p. 281-6.
298. Lins, R.D., et al., *Immunohistochemical evaluation of the inflammatory response in periodontal disease*. Braz Dent J, 2008. **19**(1): p. 9-14.
299. Lins, R.D., et al., *Immunohistochemical evaluation of CD25+ cell expression in the progression of periodontal disease*. Braz Dent J, 2012. **23**(4): p. 322-7.
300. Amunulla, A., et al., *Lymphocyte subpopulation in healthy and diseased gingival tissue*. J Indian Soc Periodontol, 2008. **12**(2): p. 45-50.
301. Saez de Guinoa, J., et al., *CXCL13/CXCR5 signaling enhances BCR-triggered B-cell activation by shaping cell dynamics*. Blood, 2011. **118**(6): p. 1560-9.
302. Gao, J., et al., *Novel functions of murine B1 cells: Active phagocytic and microbicidal abilities*. European Journal of Immunology, 2012. **42**(4): p. 982-992.

## Références

303. Ali, M.F., et al., *beta-Glucan-Activated Human B Lymphocytes Participate in Innate Immune Responses by Releasing Proinflammatory Cytokines and Stimulating Neutrophil Chemotaxis*. J Immunol, 2015. **195**(11): p. 5318-26.
304. Horowitz, M.C., J.A. Fretz, and J.A. Lorenzo, *How B cells influence bone biology in health and disease*. Bone, 2010. **47**(3): p. 472-9.
305. Ali, J., et al., *Autoimmune responses in periodontal diseases*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(7): p. 426-31.
306. Zouali, M. and G. Tsay, *Developing connections amongst B lymphocytes and deregulated pathways in autoimmunity*. Mol Med, 2016. **22**.
307. Caetano-Lopes, J., H. Canhao, and J.E. Fonseca, *Osteoimmunology--the hidden immune regulation of bone*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(3): p. 250-5.
308. Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind, *B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult*. Immunity, 2012. **36**(1): p. 13-21.
309. Prieto, J.M.B. and M.J.B. Felipe, *Development, phenotype, and function of non-conventional B cells*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2017. **54**: p. 38-44.
310. Renaudineau, Y., et al., *An alternative exon 1 of the CD5 gene regulates CD5 expression in human B lymphocytes*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2781-9.
311. Herzenberg, L.A., *Layered evolution in the immune system: a view from history*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1362**: p. 1-5.
312. Montecino-Rodriguez, E., H. Leathers, and K. Dorshkind, *Identification of a B-1 B cell-specified progenitor*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 293-301.
313. Ghosn, E.E., et al., *Distinct B-cell lineage commitment distinguishes adult bone marrow hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(14): p. 5394-8.
314. Rothstein, T.L., et al., *Human B-1 cells take the stage*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1285**: p. 97-114.
315. Baumgarth, N., *The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(1): p. 34-46.
316. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *Perspectives on fetal derived CD5+ B1 B cells*. Eur J Immunol, 2015. **45**(11): p. 2978-84.
317. Wang, J., et al., *Fetal and adult progenitors give rise to unique populations of CD8+ T cells*. Blood, 2016. **128**(26): p. 3073-3082.
318. Li, Y.S., et al., *A developmental switch between fetal and adult B lymphopoiesis*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1362**: p. 8-15.
319. Carsetti, R., M.M. Rosado, and H. Wardmann, *Peripheral development of B cells in mouse and man*. Immunol Rev, 2004. **197**: p. 179-91.
320. Dono, M., et al., *The human marginal zone B cell*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **987**: p. 117-24.
321. Yang, Y., et al., *Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4542-6.
322. Panda, S. and J.L. Ding, *Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity*. J Immunol, 2015. **194**(1): p. 13-20.
323. Griffin, D.O. and T.L. Rothstein, *Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity*. Mol Med, 2012. **18**: p. 1003-8.
324. Griffin, D.O., N.E. Holodick, and T.L. Rothstein, *Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-*. The Journal of Experimental Medicine, 2011. **208**(1): p. 67-80.

## Références

325. Alugupalli, K.R., *A distinct role for B1b lymphocytes in T cell-independent immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **319**: p. 105-30.
326. Cunningham, A.F., et al., *B1b cells recognize protective antigens after natural infection and vaccination*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 535.
327. Gao, J., et al., *Novel functions of murine B1 cells: active phagocytic and microbicidal abilities*. Eur J Immunol, 2012. **42**(4): p. 982-92.
328. Popi, A.F., *B-1 phagocytes: the myeloid face of B-1 cells*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1362**: p. 86-97.
329. Deng, J., et al., *B1a cells play a pathogenic role in the development of autoimmune arthritis*. Oncotarget, 2016. **7**(15): p. 19299-311.
330. Duan, B. and L. Morel, *Role of B-1a cells in autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2006. **5**(6): p. 403-8.
331. Donati, M., et al., *B-1a cells in experimental gingivitis in humans*. J Periodontol, 2009. **80**(7): p. 1141-5.
332. Donati, M., et al., *B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions*. J Periodontal Res, 2009. **44**(5): p. 683-8.
333. Mohan, C., et al., *Accumulation of splenic B1a cells with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(9): p. 1652-62.
334. Griffin, D.O. and T.L. Rothstein, *A small CD11b(+) human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus*. J Exp Med, 2011. **208**(13): p. 2591-8.
335. Kawai, K., et al., *CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(1): p. 192-7.
336. Geherin, S.A., et al., *IL-10+ Innate-like B Cells Are Part of the Skin Immune System and Require alpha4beta1 Integrin To Migrate between the Peritoneum and Inflamed Skin*. J Immunol, 2016. **196**(6): p. 2514-2525.
337. Kasaian, M.T. and P. Casali, *Autoimmunity-prone B-1 (CD5 B) cells, natural antibodies and self recognition*. Autoimmunity, 1993. **15**(4): p. 315-29.
338. Kaur, G., K. Mohindra, and S. Singla, *Autoimmunity-Basics and link with periodontal disease*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(1): p. 64-71.
339. Mathias, A., et al., *Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria*. Gut Microbes, 2014. **5**(6): p. 688-695.
340. Rangbulla, V., et al., *Salivary IgA, Interleukin-1beta and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients*. Chin J Dent Res, 2017. **20**(1): p. 43-51.
341. Popi, A.F., I.M. Longo-Maugeri, and M. Mariano, *An Overview of B-1 Cells as Antigen-Presenting Cells*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 138.
342. Meyer-Bahlburg, A. and D.J. Rawlings, *Differential impact of Toll-like receptor signaling on distinct B cell subpopulations*. Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 1499-516.
343. Genestier, L., et al., *TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7779-86.
344. Ng, L.G., et al., *BAFF costimulation of Toll-like receptor-activated B-1 cells*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1837-46.
345. Sato, T., et al., *Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus*. Eur J Immunol, 2004. **34**(12): p. 3346-58.
346. Zhong, X., et al., *Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(9): p. 2400-4.

## Références

347. Simon, Q., et al., *In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(5): p. 1577-1584 e10.
348. Wardemann, H., et al., *Predominant autoantibody production by early human B cell precursors*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1374-7.
349. Pelanda, R. and R.M. Torres, *Central B-cell tolerance: where selection begins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(4): p. a007146.
350. Sims, G.P., et al., *Identification and characterization of circulating human transitional B cells*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4390-8.
351. Loder, F., et al., *B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals*. J Exp Med, 1999. **190**(1): p. 75-89.
352. Iwata, Y., et al., *Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells*. Blood, 2011. **117**(2): p. 530-41.
353. Aviszus, K., et al., *Antigen-specific suppression of humoral immunity by anergic Ars/Al B cells*. J Immunol, 2012. **189**(9): p. 4275-83.
354. Lee, J., et al., *Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4116-26.
355. Sim, J.H., et al., *Autoregulatory function of interleukin-10-producing pre-naive B cells is defective in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 190.
356. Briere, F., et al., *Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 757-62.
357. Avery, D.T., et al., *IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(3): p. 1767-1779.
358. Deenick, E.K., et al., *Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells*. J Exp Med, 2013. **210**(12): p. 2739-53.
359. Inman, C.F., et al., *Most B cells in non-lymphoid tissues are naive*. Immunol Cell Biol, 2012. **90**(2): p. 235-42.
360. Kurosaki, T., K. Kometani, and W. Ise, *Memory B cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 149-59.
361. Mesin, L., J. Ersching, and G.D. Victora, *Germinal Center B Cell Dynamics*. Immunity, 2016. **45**(3): p. 471-482.
362. Choe, J. and Y.S. Choi, *IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 508-15.
363. Barr, T.A., et al., *TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(11): p. 3040-53.
364. Pillai, S. and A. Cariappa, *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 767-77.
365. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 161-96.
366. Cinamon, G., et al., *Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 54-62.
367. Kuijpers, T.W., et al., *CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 214-22.
368. O'Connell, F.P., J.L. Pinkus, and G.S. Pinkus, *CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms*. Am J Clin Pathol, 2004. **121**(2): p. 254-63.

## Références

369. Nutt, S.L., et al., *The generation of antibody-secreting plasma cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 160-71.
370. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
371. Minnich, M., et al., *Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation*. Nat Immunol, 2016. **17**(3): p. 331-43.
372. Martins, G. and K. Calame, *Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 133-69.
373. Moens, L. and S.G. Tangye, *Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage*. Frontiers in Immunology, 2014. **5**.
374. Luu, V.P., M.I. Vazquez, and A. Zlotnik, *B cells participate in tolerance and autoimmunity through cytokine production*. Autoimmunity, 2014. **47**(1): p. 1-12.
375. Turner, M.D., et al., *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): p. 2563-2582.
376. Jacquot, S. and O. Boyer, *Hétérogénéité et fonctions des lymphocytes B chez l'homme*. médecine/sciences, 2006. **22**(12): p. 1075-1080.
377. Seifert, M. and R. Kuppers, *Human memory B cells*. Leukemia, 2016. **30**(12): p. 2283-2292.
378. Sanz, I., et al., *Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells*. Semin Immunol, 2008. **20**(1): p. 67-82.
379. Ise, W., et al., *Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(32): p. 11792-7.
380. Weller, S. and M. Descatoire, *[IgM+IgD+CD27+ B cells in human: an essential role in the protection against encapsulated bacteria]*. Med Sci (Paris), 2015. **31**(6-7): p. 647-53.
381. Dogan, I., et al., *Multiple layers of B cell memory with different effector functions*. Nat Immunol, 2009. **10**(12): p. 1292-9.
382. Schneider, P., *The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 282-9.
383. Sakai, J. and M. Akkoyunlu, *The Role of BAFF System Molecules in Host Response to Pathogens*. Clin Microbiol Rev, 2017. **30**(4): p. 991-1014.
384. Abe, T., et al., *The B Cell-Stimulatory Cytokines BLyS and APRIL Are Elevated in Human Periodontitis and Are Required for B Cell-Dependent Bone Loss in Experimental Murine Periodontitis*. J Immunol, 2015. **195**(4): p. 1427-35.
385. Goode, I., H. Xu, and S.T. Ildstad, *Regulatory B Cells: The New "It" Cell*. Transplant Proc, 2013.
386. Rosser, E.C. and C. Mauri, *Regulatory B cells: origin, phenotype, and function*. Immunity, 2015. **42**(4): p. 607-12.
387. Lykken, J.M., K.M. Candando, and T.F. Tedder, *Regulatory B10 cell development and function*. Int Immunol, 2015. **27**(10): p. 471-7.
388. Rincon-Arevalo, H., et al., *Regulatory B Cells and Mechanisms*. Int Rev Immunol, 2016. **35**(2): p. 156-76.
389. Tedder, T.F., *B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset*. J Immunol, 2015. **194**(4): p. 1395-401.
390. Mauri, C. and M. Menon, *Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential*. J Clin Invest, 2017. **127**(3): p. 772-779.
391. Vadasz, Z., et al., *B-regulatory cells in autoimmunity and immune mediated inflammation*. FEBS Lett, 2013. **587**(13): p. 2074-8.
392. Wang, Y., et al., *B10 cells alleviate periodontal bone loss in experimental periodontitis*. Infect Immun, 2017.

## Références

393. Ueda, Y., et al., *Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 47-58.
394. Ebersole, J.L., D. Cappelli, and S.C. Holt, *Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question?* Acta Odontol Scand, 2001. **59**(3): p. 161-6.
395. Mackler, B.F., et al., *IgG subclasses in human periodontal disease. I. Distribution and incidence of IgG subclass bearing lymphocytes and plasma cells*. J Periodontal Res, 1978. **13**(2): p. 109-19.
396. Garant, P.R., K.S. Paik, and M.I. Cho, *Fibroblast cytotoxicity associated with plasma cells and lymphocytes in chronic periodontitis lesions in rats*. J Periodontol, 1983. **54**(9): p. 551-6.
397. Pietruska, M.D., et al., *Evaluation of lymphocyte populations and subpopulations extracted from inflamed periodontal tissues*. Roczn Akad Med Białymst, 2002. **47**: p. 218-25.
398. Yeo, J.F., *Binucleated form of plasma cells in oral lesions ... a review*. Singapore Dent J, 1986. **11**(1): p. 27-30.
399. Yeo, J.F., *Binucleated form of plasma cells in oral lesions--their "vital statistics"*. Ann Acad Med Singapore, 1986. **15**(3): p. 365-9.
400. Kim, Y.C., et al., *Presence of Porphyromonas gingivalis and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis*. Oral Dis, 2010. **16**(4): p. 375-81.
401. Berglundh, T. and M. Donati, *Aspects of adaptive host response in periodontitis*. J Clin Periodontol, 2005. **32 Suppl 6**: p. 87-107.
402. Pazandak, D.P., R.S. Rogers, 3rd, and C.M. Reeve, *T and B lymphocyte distribution in periodontal disease*. J Periodontol, 1978. **49**(12): p. 625-30.
403. Taubman, M.A., et al., *Host response in experimental periodontal disease*. J Dent Res, 1984. **63**(3): p. 455-60.
404. Sabouri, Z., et al., *IgD attenuates the IgM-induced anergy response in transitional and mature B cells*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13381.
405. Geisberger, R., M. Lamers, and G. Achatz, *The riddle of the dual expression of IgM and IgD*. Immunology, 2006. **118**(4): p. 429-37.
406. Toto, P.D., L. Lin, and A. Gargiulo, *Identification of C3a, IgG, IgM in inflamed human gingiva*. J Dent Res, 1978. **57**(5-6): p. 696.
407. Toto, P.D., L.M. Lin, and A.W. Gargiulo, *Immunoglobulins and complement in human periodontitis*. J Periodontol, 1978. **49**(12): p. 631-4.
408. Okada, H., T. Kida, and H. Yamagami, *Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis*. Infect Immun, 1983. **41**(1): p. 365-74.
409. Kinane, D.F., K. Takahashi, and J. Mooney, *Crevicular fluid and serum IgG subclasses and corresponding mRNA expressing plasma cells in periodontitis lesions*. J Periodontal Res, 1997. **32**(1 Pt 2): p. 176-8.
410. Van Swol, R.L., et al., *Immunoglobulins in periodontal tissues. II. Concentrations of immunoglobulins in granulation tissue from pockets of periodontosis and periodontitis patients*. J Periodontol, 1980. **51**(1): p. 20-4.
411. Waldrop, T.C., et al., *Immunologic study of human periodontosis (juvenile periodontitis)*. J Periodontol, 1981. **52**(1): p. 8-15.
412. Quinn, S.M., et al., *Influence of smoking and race on immunoglobulin G subclass concentrations in early-onset periodontitis patients*. Infect Immun, 1996. **64**(7): p. 2500-5.
413. Zhang, J.B., et al., *Hyper-immunoglobulin G2 production by B cells from patients with localized juvenile periodontitis and its regulation by monocytes*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 2004-9.

## Références

414. Takahashi, K., et al., *IgG and IgA subclass mRNA-bearing plasma cells in periodontitis gingival tissue and immunoglobulin levels in the gingival crevicular fluid*. Clin Exp Immunol, 1997. **107**(1): p. 158-65.
415. Ardila, C.M. and I.C. Guzman, *High levels of Porphyromonas gingivalis-induced immunoglobulin G2 are associated with lower high-density lipoprotein levels in chronic periodontitis*. J Investig Clin Dent, 2016. **7**(4): p. 368-375.
416. Kono, Y., et al., *Cytokine regulation of localized inflammation. Induction of activated B cells and IL-6-mediated polyclonal IgG and IgA synthesis in inflamed human gingiva*. J Immunol, 1991. **146**(6): p. 1812-21.
417. Fujihashi, K., et al., *Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues*. J Periodontol, 1993. **64**(5 Suppl): p. 400-6.
418. Nisengard, R.J., et al., *Humoral immunologic responses in idiopathic juvenile periodontitis (periodontosis)*. J Periodontol, 1980. **51**(1): p. 30-3.
419. Nikolopoulou-Papaconstantinou, A.A., A.C. Johannessen, and T. Kristoffersen, *Deposits of immunoglobulins, complement, and immune complexes in inflamed human gingiva*. Acta Odontol Scand, 1987. **45**(3): p. 187-93.
420. Mizutani, Y., et al., *In situ visualization of plasma cells producing antibodies reactive to Porphyromonas gingivalis in periodontitis: the application of the enzyme-labeled antigen method*. Mol Oral Microbiol, 2014. **29**(4): p. 156-73.
421. Kowashi, Y., F. Jaccard, and G. Cimasoni, *Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man*. Arch Oral Biol, 1979. **24**(9): p. 645-50.
422. Ohlsson, K., I. Olsson, and G. Tynelius-Bratthall, *Neutrophil leukocyte collagenase, elastase and serum protease inhibitors in human gingival crevices*. Acta Odontol Scand, 1974. **32**(1): p. 51-9.
423. Di Girolamo, N., et al., *Expression of matrix metalloproteinases by human plasma cells and B lymphocytes*. Eur J Immunol, 1998. **28**(6): p. 1773-84.
424. Wahlgren, J., et al., *Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions*. J Pathol, 2001. **194**(2): p. 217-24.
425. Gemmell, E. and G.J. Seymour, *Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases*. J Dent Res, 1998. **77**(1): p. 16-26.
426. Gemmell, E., C.L. Carter, and G.J. Seymour, *Chemokines in human periodontal disease tissues*. Clin Exp Immunol, 2001. **125**(1): p. 134-41.
427. Donaldson, S.L., R.R. Ranney, and J.G. Tew, *B-lymphocyte blastogenesis in response to periodontitis-associated bacteria. Kinetics and proportion of total response*. J Periodontol, 1984. **55**(6): p. 359-63.
428. Seymour, G.J., *Possible mechanisms involved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease*. J Dent Res, 1987. **66**(1): p. 2-9.
429. Emingil, G., et al., *Phenotypic and functional analysis of peripheral blood mononuclear cells in generalised aggressive and chronic periodontitis patients*. J Int Acad Periodontol, 2001. **3**(4): p. 87-94.
430. Harada, Y., et al., *Polyclonal induction of IgG antibody forming cells by stimulation with Actinomyces viscosus T14V*. J Periodontal Res, 1988. **23**(2): p. 122-6.
431. Okada, H., et al., *The function of gingival lymphocytes on the establishment of human periodontitis*. Adv Dent Res, 1988. **2**(2): p. 364-7.
432. Okada, H., H. Ito, and Y. Harada, *T-cell requirement for establishment of the IgG-dominant B-cell lesion in periodontitis*. J Periodontal Res, 1987. **22**(3): p. 187-9.



## Références

433. Clagett, J., D. Engel, and E. Chi, *In vitro* expression of immunoglobulin M and G subclasses by murine B lymphocytes in response to a polyclonal activator from *Actinomyces*. *Infect Immun*, 1980. **29**(1): p. 234-43.
434. Hahn, C.L., H.A. Schenkein, and J.G. Tew, *Polyclonal B cell activators and in vitro induction of auto-antibody reactive with collagen*. *J Periodontal Res*, 1997. **32**(7): p. 608-13.
435. Mahanonda, R., et al., *Upregulation of co-stimulatory molecule expression and dendritic cell marker (CD83) on B cells in periodontal disease*. *J Periodontal Res*, 2002. **37**(3): p. 177-83.
436. Tew, J., D. Engel, and D. Mangan, *Polyclonal B-cell activation in periodontitis*. *J Periodontal Res*, 1989. **24**(4): p. 225-41.
437. Yoshie, H., et al., *Periodontal bone loss and immune characteristics after adoptive transfer of Actinobacillus-sensitized T cells to rats*. *J Periodontal Res*, 1987. **22**(6): p. 499-505.
438. Smith, S., et al., *Polyclonal B-cell activation: severe periodontal disease in young adults*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1980. **16**(3): p. 354-66.
439. Choi, Y. and J.J. Kim, *B cells activated in the presence of Th1 cytokines inhibit osteoclastogenesis*. *Exp Mol Med*, 2003. **35**(5): p. 385-92.
440. Harris, D.P., et al., *Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 475-82.
441. Colucci, S., et al., *Interleukin-7 production by B lymphocytes affects the T cell-dependent osteoclast formation in an in vitro model derived from human periodontitis patients*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2005. **18**(3 Suppl): p. 13-9.
442. Sammiceli, S., et al., *IL-7 modulates B cells survival and activation by inducing BAFF and CD70 expression in T cells*. *J Autoimmun*, 2012. **38**(4): p. 304-14.
443. Lin, J., et al., *The role of IL-7 in Immunity and Cancer*. *Anticancer Res*, 2017. **37**(3): p. 963-967.
444. Zaunders, J.J., Y. Levy, and N. Seddiki, *Exploiting differential expression of the IL-7 receptor on memory T cells to modulate immune responses*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014. **25**(4): p. 391-401.
445. Bikker, A., et al., *Interleukin-7 and Toll-like receptor 7 induce synergistic B cell and T cell activation*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94756.
446. Ceredig, R. and A.G. Rolink, *The key role of IL-7 in lymphopoiesis*. *Semin Immunol*, 2012. **24**(3): p. 159-64.
447. Corfe, S.A. and C.J. Paige, *The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation*. *Semin Immunol*, 2012. **24**(3): p. 198-208.
448. Taubman, M.A., et al., *Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease*. *J Periodontol*, 2005. **76**(11 Suppl): p. 2033-41.
449. Han, X., et al., *Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption*. *J Immunol*, 2006. **176**(1): p. 625-31.
450. Wu, Y., et al., *Facilitated antigen presentation by B cells expressing IgD when responding T cells express IgD-receptors*. *Cell Immunol*, 1999. **192**(2): p. 194-202.
451. Takeuchi, Y., H. Yoshie, and K. Hara, *Expression of interleukin-2 receptor and HLA-DR on lymphocyte subsets of gingival crevicular fluid in patients with periodontitis*. *J Periodontal Res*, 1991. **26**(6): p. 502-10.
452. Fujihashi, K., et al., *Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissues produce interleukin (IL)-5 and IL-6 but not IL-2 and IL-4*. *Am J Pathol*, 1993. **142**(4): p. 1239-50.
453. Fujihashi, K., Y. Kono, and H. Kiyono, *Effects of IL6 on B cells in mucosal immune response and inflammation*. *Res Immunol*, 1992. **143**(7): p. 744-9.

## Références

454. Sempowski, G.D., et al., *CD40 mediated activation of gingival and periodontal ligament fibroblasts*. J Periodontol, 1997. **68**(3): p. 284-92.
455. Gumus, P., et al., *Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor-alpha in patients with periodontitis*. J Periodontol, 2014. **85**(2): p. 270-80.
456. Gemmell, E. and G.J. Seymour, *Different responses in B cells induced by Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum*. Arch Oral Biol, 1992. **37**(7): p. 565-73.
457. Gemmell, E. and G.J. Seymour, *Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor-beta production by human gingival mononuclear cells following stimulation with Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum*. J Periodontal Res, 1993. **28**(2): p. 122-9.
458. Homayounfar, A., J. Bergstrom, and L. Hammarstrom, *Activation of human B-lymphocytes by Prevotella intermedia*. Swed Dent J, 1999. **23**(1): p. 11-5.
459. Jagannathan, M., et al., *TLR cross-talk specifically regulates cytokine production by B cells from chronic inflammatory disease patients*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7461-70.
460. Cutler, C.W., et al., *Evidence and a novel hypothesis for the role of dendritic cells and Porphyromonas gingivalis in adult periodontitis*. J Periodontal Res, 1999. **34**(7): p. 406-12.
461. Ebersole, J.L., et al., *Systemic manifestations of periodontitis in the non-human primate*. J Periodontal Res, 1999. **34**(7): p. 358-62.
462. Brandtzaeg, P. and F.W. Kraus, *Autoimmunity and Periodontal Disease*. Odontol Tidskr, 1965. **73**: p. 281-393.
463. Hirsch, H.Z., et al., *Autoimmunity to collagen in adult periodontal disease*. J Oral Pathol, 1988. **17**(9-10): p. 456-9.
464. Stein, S.H., et al., *Interleukin-10 promotes anti-collagen antibody production in type I diabetic peripheral B lymphocytes*. J Periodontal Res, 1997. **32**(1 Pt 2): p. 189-95.
465. Sanjabi, S., et al., *Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(4): p. 447-53.
466. Gaddis, D.E., et al., *Role of TLR2-dependent IL-10 production in the inhibition of the initial IFN-gamma T cell response to Porphyromonas gingivalis*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(1): p. 21-31.
467. Alhakeem, S.S., et al., *Role of B cell receptor signaling in IL-10 production by normal and malignant B-1 cells*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1362**: p. 239-249.
468. Liu, Z., et al., *Toll-like receptor agonists Porphyromonas gingivalis LPS and CpG differentially regulate IL-10 competency and frequencies of mouse B10 cells*. J Appl Oral Sci, 2017. **25**(1): p. 90-100.
469. Cindric, G., et al., *Lymphocyte subpopulations and the expression of intercellular adhesion molecules in chronic periodontitis*. Coll Antropol, 2004. **28**(2): p. 825-32.
470. Wang, L., X.-H. Li, and W.-C. Ning, *Evaluation of ICAM-1 and VCAM-1 Gene Polymorphisms in Patients with Periodontal Disease*. Medical Science Monitor, 2016. **22**: p. 2386-2391.
471. Larjava, H., et al., *Integrins in periodontal disease*. Experimental Cell Research, 2014. **325**(2): p. 104-110.
472. Yu, P., et al., *Local Induction of B Cell Interleukin-10 Competency Alleviates Inflammation and Bone Loss in Ligature-Induced Experimental Periodontitis in Mice*. Infect Immun, 2017. **85**(1).

## Références

473. Dai, J., et al., *Evaluation of interleukin-10 producing CD19+ B cells in human gingival tissue*. Arch Oral Biol, 2017. **84**: p. 112-117.
474. Hu, Y., et al., *IL-21/anti-Tim1/CD40 ligand promotes B10 activity in vitro and alleviates bone loss in experimental periodontitis in vivo*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1863**(9): p. 2149-2157.
475. Browne, E.P., *Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors*. Immunology, 2012. **136**(4): p. 370-9.
476. Su, E.W., J.Y. Lin, and L.P. Kane, *TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation*. Cytokine, 2008. **44**(1): p. 9-13.
477. Jarry, C.R., et al., *Expression of SOFAT by T- and B-lineage cells may contribute to bone loss*. Mol Med Rep, 2016. **13**(5): p. 4252-8.
478. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
479. Nagata, S. and T. Suda, *Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations*. Immunol Today, 1995. **16**(1): p. 39-43.
480. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 305-34.
481. Yang, J., et al., *Porphyromonas gingivalis infection reduces regulatory T cells in infected atherosclerosis patients*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86599.
482. Luo, A., et al., *The Microbiota and Epigenetic Regulation of T Helper 17/Regulatory T Cells: In Search of a Balanced Immune System*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 417.
483. Lewis, K.L. and B. Reizis, *Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(8): p. a007401.
484. Agrawal, A., S. Agrawal, and S. Gupta, *Role of Dendritic Cells in Inflammation and Loss of Tolerance in the Elderly*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 896.
485. Mahamed, D.A., et al., *G(-) anaerobes-reactive CD4+ T-cells trigger RANKL-mediated enhanced alveolar bone loss in diabetic NOD mice*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1477-86.
486. Buhlin, K., et al., *Association of periodontitis with persistent, pro-atherogenic antibody responses*. J Clin Periodontol, 2015. **42**(11): p. 1006-14.
487. Napimoga, M.H., et al., *Possible involvement of IL-21 and IL-10 on salivary IgA levels in chronic periodontitis subjects*. Scand J Immunol, 2011. **74**(6): p. 596-602.
488. Ting, J.P. and J. Trowsdale, *Genetic control of MHC class II expression*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S21-33.
489. Rouhani, S.J., et al., *Roles of lymphatic endothelial cells expressing peripheral tissue antigens in CD4 T-cell tolerance induction*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6771.
490. Gonzalez, O.A., et al., *Comparative analysis of gingival tissue antigen presentation pathways in ageing and periodontitis*. J Clin Periodontol, 2014. **41**(4): p. 327-39.
491. Bar, F., et al., *Inflammatory bowel diseases influence major histocompatibility complex class I (MHC I) and II compartments in intestinal epithelial cells*. Clin Exp Immunol, 2013. **172**(2): p. 280-9.
492. Giroux, M., M. Schmidt, and A. Descoteaux, *IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha*. J Immunol, 2003. **171**(8): p. 4187-94.
493. Nair, S., M. Faizuddin, and J. Dharmapalan, *Role of autoimmune responses in periodontal disease*. Autoimmune Dis, 2014. **2014**: p. 596824.
494. Wang, C., et al., *Characterization of a natural mouse monoclonal antibody recognizing epitopes shared by oxidized low-density lipoprotein and chaperonin 60 of Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Immunol Res, 2016. **64**(3): p. 699-710.
495. Kwon, E.Y., et al., *Pep19 drives epitope spreading in periodontitis and periodontitis-associated autoimmune diseases*. J Periodontal Res, 2016. **51**(3): p. 381-94.

## Références

496. Meghji, S., et al., *Human chaperonin 60 (Hsp60) stimulates bone resorption: structure/function relationships*. Bone, 2003. **33**(3): p. 419-25.
497. Wang, C. and S. Horkko, *Natural Monoclonal Antibody to Oxidized Low-Density Lipoprotein and Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Methods Mol Biol, 2017. **1643**: p. 155-167.
498. Rohini, N.V., A.R. Pradeep, and M. Faizuddin, *Antineutrophil cytoplasmic antibodies and adult periodontitis*. J Periodontal Res, 2000. **35**(6): p. 374-6.
499. Yamazaki, K., H. Yoshie, and G.J. Seymour, *T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases*. Histol Histopathol, 2003. **18**(3): p. 889-96.
500. Stabholz, A., W.A. Soskolne, and L. Shapira, *Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis*. Periodontol 2000, 2010. **53**: p. 138-53.
501. Sippert, E.A., et al., *HLA Haplotypes and Genotypes Frequencies in Brazilian Chronic Periodontitis Patients*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 481656.
502. Thibult, M.L., et al., *PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation*. Int Immunol, 2013. **25**(2): p. 129-37.
503. Routy, B., et al., *Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors*. Science, 2017.
504. Burki, T.K., *Gut microbiome and immunotherapy response*. Lancet Oncol, 2017.
505. Gopalakrishnan, V., et al., *Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients*. Science, 2017.
506. Bae, S.C. and Y.H. Lee, *Association between anti-Porphyromonas gingivalis antibody, anti-citrullinated protein antibodies, and rheumatoid arthritis : A meta-analysis*. Z Rheumatol, 2017.
507. Hunter, C.A. and S.A. Jones, *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease*. Nat Immunol, 2015. **16**(5): p. 448-57.
508. Mahmood, Z., et al., *CD27-IgD- memory B cells are modulated by in vivo interleukin-6 receptor (IL-6R) blockade in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 61.
509. Kobayashi, T., et al., *Assessment of interleukin-6 receptor inhibition therapy on periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis and chronic periodontitis*. J Periodontol, 2014. **85**(1): p. 57-67.
510. Kobayashi, T., et al., *Interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab ameliorates periodontal inflammation in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis as well as tumor necrosis factor inhibitors*. Clinical and Experimental Dental Research, 2015. **1**(2): p. 63-73.
511. Vandevoorde, V., G. Haegeman, and W. Fiers, *Tumor necrosis factor-induced interleukin-6 expression and cytotoxicity follow a common signal transduction pathway in L929 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **178**(3): p. 993-1001.
512. Hong, S.S., et al., *A Novel Small-Molecule Inhibitor Targeting the IL-6 Receptor beta Subunit, Glycoprotein 130*. J Immunol, 2015. **195**(1): p. 237-45.
513. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
514. Calabrese, L.H. and S. Rose-John, *IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(12): p. 720-7.
515. Sawada, S., et al., *Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1beta and IL-6*. Biomed Res, 2013. **34**(1): p. 31-40.
516. Gemmell, E., R.I. Marshall, and G.J. Seymour, *Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease*. Periodontol 2000, 1997. **14**: p. 112-43.

## Références

517. Rieckmann, P., J.M. Tuscano, and J.H. Kehrl, *Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) in B-lymphocyte function*. *Methods*, 1997. **11**(1): p. 128-32.
518. Garaud, S., et al., *IL-6 modulates CD5 expression in B cells from patients with lupus by regulating DNA methylation*. *J Immunol*, 2009. **182**(9): p. 5623-32.
519. Diaz-Torne, C., et al., *The combination of IL-6 and its soluble receptor is associated with the response of rheumatoid arthritis patients to tocilizumab*. *Semin Arthritis Rheum*, 2017.
520. Pascart, T., et al., *Comparative efficacy of tocilizumab, abatacept and rituximab after non-TNF inhibitor failure: results from a multicentre study*. *Int J Rheum Dis*, 2016. **19**(11): p. 1093-1102.
521. Hamze, M., C. Desmetz, and P. Guglielmi, *[B lymphocytes: a promising target to treat atherosclerosis?]*. *Med Sci (Paris)*, 2014. **30**(10): p. 874-81.
522. Weiner, G.J. and B.K. Link, *Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma*. *Expert Opin Biol Ther*, 2004. **4**(3): p. 375-85.
523. Tsiantoulas, D., et al., *Targeting B cells in atherosclerosis: closing the gap from bench to bedside*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(2): p. 296-302.
524. Gumus, P., et al., *Gingival crevicular fluid and serum levels of APRIL, BAFF and TNF-alpha in rheumatoid arthritis and osteoporosis patients with periodontal disease*. *Arch Oral Biol*, 2013. **58**(10): p. 1302-8.
525. Hein, G., et al., *Influence of Rituximab on markers of bone remodeling in patients with rheumatoid arthritis: a prospective open-label pilot study*. *Rheumatol Int*, 2011. **31**(2): p. 269-72.
526. Schioppo, T. and F. Ingegnoli, *Current perspective on rituximab in rheumatic diseases*. *Drug Des Devel Ther*, 2017. **11**: p. 2891-2904.
527. Mok, C.C., *Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update*. *Drug Des Devel Ther*, 2013. **8**: p. 87-100.
528. Morbach, H., et al., *Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood*. *Clin Exp Immunol*, 2010. **162**(2): p. 271-9.
529. Wang, R., et al., *Regulation of activation-induced receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) expression in T cells*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(4): p. 1090-8.
530. Muthukuru, M., *Technical advance: decreased helper T cells and increased natural killer cells in chronic periodontitis analyzed by a novel method for isolating resident lymphocytes*. *J Leukoc Biol*, 2012. **92**(3): p. 683-92.
531. Wu, Y.C., D. Kipling, and D.K. Dunn-Walters, *The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood*. *Front Immunol*, 2011. **2**: p. 81.
532. Weller, S., et al., *Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire*. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3647-54.
533. Schmidt, J., et al., *General immune status and oral microbiology in patients with different forms of periodontitis and healthy control subjects*. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e109187.
534. Corsiero, E., et al., *Accumulation of self-reactive naive and memory B cell reveals sequential defects in B cell tolerance checkpoints in Sjogren's syndrome*. *PLoS One*, 2014. **9**(12): p. e114575.
535. Stansky, E., et al., *B Cell Anomalies in Autoimmune Retinopathy (AIR)*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017. **58**(9): p. 3600-3607.

## Références

536. Rodriguez-Bayona, B., et al., *Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. R108.
537. Anolik, J.H., et al., *Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(9): p. 3044-56.
538. Moura, R.A., et al., *B-cell phenotype and IgD-CD27- memory B cells are affected by TNF-inhibitors and tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0182927.
539. Carvajal Alegria, G., et al., *Correction of abnormal B-cell subset distribution by interleukin-6 receptor blockade in polymyalgia rheumatica*. Rheumatology (Oxford), 2017. **56**(8): p. 1401-1406.
540. Frasca, D., et al., *Obesity decreases B cell responses in young and elderly individuals*. Obesity (Silver Spring), 2016. **24**(3): p. 615-25.
541. Zeng, B., et al., *Treg cells are negatively correlated with increased memory B cells in pre-eclampsia while maintaining suppressive function on autologous B-cell proliferation*. Am J Reprod Immunol, 2013. **70**(6): p. 454-63.
542. Sugita, N., et al., *Association of the FcgammaRIIB-nt645+25A/G polymorphism with the expression level of the FcgammaRIIb receptor, the antibody response to Porphyromonas gingivalis and the severity of periodontitis*. J Periodontal Res, 2012. **47**(1): p. 105-13.
543. Hendler, A., et al., *Involvement of autoimmunity in the pathogenesis of aggressive periodontitis*. J Dent Res, 2010. **89**(12): p. 1389-94.
544. Aranburu, A., et al., *TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7293-301.
545. Slaney, J.M., et al., *Mechanisms of resistance of Porphyromonas gingivalis to killing by serum complement*. Infect Immun, 2006. **74**(9): p. 5352-61.
546. Claes, N., et al., *Age-Associated B Cells with Proinflammatory Characteristics Are Expanded in a Proportion of Multiple Sclerosis Patients*. J Immunol, 2016. **197**(12): p. 4576-4583.
547. Titanji, K., et al., *Dysregulated B cell expression of RANKL and OPG correlates with loss of bone mineral density in HIV infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(10): p. e1004497.
548. Meednu, N., et al., *Production of RANKL by Memory B Cells: A Link Between B Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(4): p. 805-16.
549. Nagasawa, T., *Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 107-16.
550. Ryder, M.I., *An update on HIV and periodontal disease*. J Periodontol, 2002. **73**(9): p. 1071-8.
551. Chiodi, F., et al., *IL-7 and CD4 T Follicular Helper Cells in HIV-1 Infection*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 451.
552. Noguera-Julian, M., et al., *Oral microbiome in HIV-associated periodontitis*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(12): p. e5821.
553. Zhang, L., et al., *Effects of IL-10 and glucose on expression of OPG and RANKL in human periodontal ligament fibroblasts*. Braz J Med Biol Res, 2016. **49**(4): p. e4324.
554. Fillatreau, S., D. Gray, and S.M. Anderton, *Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 391-7.

## Références

555. Lampropoulou, V., et al., *TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4763-73.
556. Okui, T., et al., *The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis*. J Dent Res, 2012. **91**(6): p. 574-9.
557. Kasprzak, A., et al., *Role of high endothelial postcapillary venules and selected adhesion molecules in periodontal diseases: a review*. J Periodontal Res, 2013. **48**(1): p. 1-21.
558. Pers, J.O., et al., *The role of CD5-expressing B cells in health and disease (review)*. Int J Mol Med, 1999. **3**(3): p. 239-45.
559. Werner-Favre, C., et al., *Cell surface antigen CD5 is a marker for activated human B cells*. Eur J Immunol, 1989. **19**(7): p. 1209-13.
560. Youinou, P. and Y. Renaudineau, *The paradox of CD5-expressing B cells in systemic lupus erythematosus*. Autoimmun Rev, 2007. **7**(2): p. 149-54.
561. Omar, H.H., et al., *CD5+ B lymphocytes in systemic lupus erythematosus patients: relation to disease activity*. Clin Rheumatol, 2017. **36**(12): p. 2719-2726.
562. Gounari, E., et al., *CD5+ B lymphoproliferative disorder with subsequent development of plasma cell leukaemia: Diagnostic and aetiologic reasoning*. Cytometry B Clin Cytom, 2017.
563. Ansel, K.M., R.B. Harris, and J.G. Cyster, *CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity*. Immunity, 2002. **16**(1): p. 67-76.
564. Ha, S.A., et al., *Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2541-50.
565. Sindhava, V., et al., *Interleukin-10 mediated autoregulation of murine B-1 B-cells and its role in Borrelia hermsii infection*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11445.
566. Sindhava, V.J. and S. Bondada, *Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 372.
567. Seymour, G.J. and E. Gemmell, *Cytokines in periodontal disease: where to from here?* Acta Odontol Scand, 2001. **59**(3): p. 167-73.
568. Goutoudi, P., E. Diza, and M. Arvanitidou, *Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis*. J Dent, 2004. **32**(7): p. 511-20.
569. Garaud, S., et al., *CD5 expression promotes IL-10 production through activation of the MAPK/Erk pathway and upregulation of TRPC1 channels in B lymphocytes*. Cell Mol Immunol, 2016.
570. Heine, G., et al., *Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts*. Eur J Immunol, 2014. **44**(6): p. 1615-21.
571. Garaud, S., et al., *CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4835-44.
572. Mageed, R.A., et al., *CD5 expression promotes multiple intracellular signaling pathways in B lymphocyte*. Autoimmun Rev, 2012. **11**(11): p. 795-8.
573. Renaudineau, Y., et al., *Role of B-cell antigen receptor-associated molecules and lipid rafts in CD5-induced apoptosis of B CLL cells*. Leukemia, 2005. **19**(2): p. 223-9.
574. Ghosn, E.E., et al., *CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(13): p. 5195-200.
575. Jamin, C., et al., *Modulation of CD72 by ligation of B cell receptor complex molecules on CD5+ B cells*. Int Immunol, 1997. **9**(7): p. 1001-9.
576. Reynaud, C.A. and J.C. Weill, *Gene profiling of CD11b(+) and CD11b(-) B1 cell subsets reveals potential cell sorting artifacts*. J Exp Med, 2012. **209**(3): p. 433-4.

## Références

577. Griffin, D.O., et al., *Human CD11b+ B1 cells are not monocytes: A reply to "Gene profiling of CD11b+ and CD11b- B1 cell subsets reveals potential cell sorting artifacts"*. J Exp Med, 2012. **209**(3): p. 434-6.
578. Mascarell, L., et al., *Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(3): p. 603-9 e5.
579. Oliveira, H.C., et al., *B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice*. Immunobiology, 2010. **215**(3): p. 215-22.
580. Hippen, K.L., L.E. Tze, and T.W. Behrens, *CD5 maintains tolerance in anergic B cells*. J Exp Med, 2000. **191**(5): p. 883-90.
581. Pers, J.O., et al., *CD5-induced apoptosis of B cells in some patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2002. **16**(1): p. 44-52.
582. Mayumi, M., et al., *IgM-mediated B cell apoptosis*. Crit Rev Immunol, 1995. **15**(3-4): p. 255-69.
583. Logdberg, L. and E.M. Shevach, *Role of the Ly 1 antigen in interleukin 1-induced thymocyte activation*. Eur J Immunol, 1985. **15**(10): p. 1007-13.
584. Trindade, S.C., et al., *Induction of interleukin (IL)-1beta, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by Porphyromonas gingivalis HmuY in humans*. J Periodontal Res, 2012. **47**(1): p. 27-32.
585. Yanaba, K., et al., *The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7459-72.
586. Li, Y., et al., *Effect of local hIL-10 gene therapy on experimental periodontitis in ovariectomized rats*. Acta Odontol Scand, 2017. **75**(4): p. 268-279.
587. Berggreen, E. and H. Wiig, *Lymphatic function and responses in periodontal disease*. Exp Cell Res, 2014. **325**(2): p. 130-7.
588. Mkonyi, L.E., et al., *Lymphangiogenesis is induced during development of periodontal disease*. J Dent Res, 2012. **91**(1): p. 71-7.
589. Mkonyi, L.E., et al., *Gingival Lymphatic Drainage Protects Against Porphyromonas gingivalis-Induced Bone Loss in Mice*. The American Journal of Pathology, 2012. **181**(3): p. 907-916.
590. Akhavanpoor, M., et al., *Adventitial tertiary lymphoid organ classification in human atherosclerosis*. Cardiovasc Pathol, 2017. **32**: p. 8-14.
591. Olivier, B.J., et al., *Vagal innervation is required for the formation of tertiary lymphoid tissue in colitis*. Eur J Immunol, 2016. **46**(10): p. 2467-2480.
592. Hwang, J.Y., T.D. Randall, and A. Silva-Sanchez, *Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 258.
593. Finke, D. and S. Schmutz, *Interleukin 7-induced lymphoid neogenesis in arthritis: recapitulation of a fetal developmental programme?* Swiss Med Wkly, 2008. **138**(35-36): p. 500-5.
594. Sakimura, C., et al., *B cells in tertiary lymphoid structures are associated with favorable prognosis in gastric cancer*. Journal of Surgical Research, 2017. **215**: p. 74-82.
595. Germain, C., et al., *Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. **189**(7): p. 832-44.
596. Palikhe, A., et al., *Lymphotoxin alpha LTA+496C allele is a risk factor for periodontitis in patients with coronary artery disease*. Tissue Antigens, 2008. **71**(6): p. 530-537.



## Références

597. Shipman, W.D., D.C. Dasoveanu, and T.T. Lu, *Tertiary lymphoid organs in systemic autoimmune diseases: pathogenic or protective?* F1000Res, 2017. **6**: p. 196.
598. Barone, F., et al., *Stromal Fibroblasts in Tertiary Lymphoid Structures: A Novel Target in Chronic Inflammation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 477.
599. Jing, F. and E.Y. Choi, *Potential of Cells and Cytokines/Chemokines to Regulate Tertiary Lymphoid Structures in Human Diseases*. Immune Netw, 2016. **16**(5): p. 271-280.
600. Kuroshima, S.-i., et al., *Expression of cys–cys chemokine ligand 21 on human gingival lymphatic vessels*. Tissue and Cell, 2004. **36**(2): p. 121-127.
601. Souto, G.R., et al., *Relationship between chemokines and dendritic cells in human chronic periodontitis*. J Periodontol, 2014. **85**(10): p. 1416-23.
602. Liukkonen, J., et al., *Salivary Concentrations of Interleukin (IL)-1beta, IL-17A, and IL-23 Vary in Relation to Periodontal Status*. J Periodontol, 2016. **87**(12): p. 1484-1491.
603. Ngo, V.N., et al., *Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 403-12.
604. Vasconcelos, D.F., et al., *Lymphotoxin-Alpha Gene Polymorphism +252A/G (rs909253, A/G) Is Associated with Susceptibility to Chronic Periodontitis: A Pilot Study*. ISRN Dent, 2012. **2012**: p. 617245.
605. Peters, A., et al., *Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation*. Immunity, 2011. **35**(6): p. 986-96.
606. Miyazaki, Y., et al., *The significance of podoplanin expression in human inflamed gingiva*. J Oral Sci, 2009. **51**(2): p. 283-7.
607. Fleige, H., et al., *IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs*. J Exp Med, 2014. **211**(4): p. 643-51.
608. Ruddle, N.H., *High Endothelial Venules and Lymphatic Vessels in Tertiary Lymphoid Organs: Characteristics, Functions, and Regulation*. Frontiers in Immunology, 2016. **7**.
609. Artese, L., et al., *Immunoexpression of angiogenesis, nitric oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis*. J Periodontol, 2010. **81**(5): p. 718-26.
610. Hughes, C.E., et al., *Antigen-Presenting Cells and Antigen Presentation in Tertiary Lymphoid Organs*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 481.
611. Khaled, M., et al., *Effects of resolvin D1 on cell survival and cytokine expression of human gingival fibroblasts*. J Periodontol, 2013. **84**(12): p. 1838-46.
612. Schulz, S., et al., *Epigenetic characteristics in inflammatory candidate genes in aggressive periodontitis*. Hum Immunol, 2016. **77**(1): p. 71-5.
613. Stratul, S.I., et al., *Clinical and histological characterization of an aggressive periodontitis case associated with unusual root canal curvatures*. Rom J Morphol Embryol, 2015. **56**(2): p. 589-96.
614. Kebschull, M., et al., *Gingival tissue transcriptomes identify distinct periodontitis phenotypes*. J Dent Res, 2014. **93**(5): p. 459-68.
615. Gillett, R., A. Cruchley, and N.W. Johnson, *The nature of the inflammatory infiltrates in childhood gingivitis, juvenile periodontitis and adult periodontitis: immunocytochemical studies using a monoclonal antibody to HLADr*. J Clin Periodontol, 1986. **13**(4): p. 281-8.
616. Cruz-Migoni, S. and J. Caamano, *Fat-Associated Lymphoid Clusters in Inflammation and Immunity*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 612.

## Références

617. Poubelle, P.E., et al., *Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(2): p. R25.
618. Kim, D., et al., *Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1467-78.
619. Dejardin, E., et al., *The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 525-35.
620. Liu, W. and X. Zhang, *Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review)*. Mol Med Rep, 2015. **11**(5): p. 3212-8.
621. Yoshida, H., et al., *Different cytokines induce surface lymphotoxin-alpha on IL-7 receptor-alpha cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches*. Immunity, 2002. **17**(6): p. 823-33.
622. Malcolm, J., et al., *IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL*. J Dent Res, 2015. **94**(7): p. 968-75.
623. Laperine, O., et al., *Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0168080.
624. Tada, H., et al., *Porphyromonas gingivalis Gingipain-Dependently Enhances IL-33 Production in Human Gingival Epithelial Cells*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0152794.
625. Dutzan, N., et al., *On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier*. Immunity, 2017. **46**(1): p. 133-147.
626. Veldhoen, M., *Th17 Cells Require You to Chew before You Swallow*. Immunity, 2017. **46**(1): p. 8-10.
627. Cottrell, G.S., et al., *Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1191-7.
628. Ahmed, A. and M.K. Koma, *Interleukin-33 Triggers B1 Cell Expansion and Its Release of Monocyte/Macrophage Chemoattractants and Growth Factors*. Scand J Immunol, 2015. **82**(2): p. 118-24.



**Titre :** Parodontite et inflammation : approche clinique et biologique du rôle du lymphocyte B.

**Mots clés :** parodontite, lymphocytes B, immunothérapies

**Résumé :** La parodontite est une pathologie immunoinflammatoire, entraînant une destruction du parodonte, suite à l'interaction entre un biofilm dysbiotique et une réponse immunitaire dérégulée. Parodontite et polyarthrite rhumatoïde présentent des mécanismes immunopathogéniques communs. Ainsi, les lymphocytes B (LB) ont un rôle majeur dans l'étiopathogénie de ces deux affections. Nous avons mené deux études cliniques observationnelles sur des cohortes de patients atteints de parodontite et traités pour leur polyarthrite rhumatoïde par deux immunothérapies touchant les LB : un anti-IL-6R (Tolicizumab) et un anti-CD20 (Rituximab). L'utilisation d'un anti-IL-6R a montré une diminution du TNF- $\alpha$  dans le fluide gingival après 6 mois de traitement, sans modification clinique de la parodontite.

Par contre, l'anti-CD20, responsable d'une déplétion en LB, a permis une amélioration des paramètres cliniques parodontaux. Ensuite, nous avons étudié le phénotype des LB dans le sang et la gencive de patients atteints de parodontites sévères. Nos résultats montrent une augmentation des LB effecteurs "mémoires switchés" et une diminution des LB1 CD11b+ régulateurs.

Notre travail a permis de mieux comprendre la distribution et le rôle des LB dans la réponse immunitaire dans les parodontites, aussi bien au niveau local que systémique et la discussion ouvre de nombreuses pistes de recherche et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

**Title:** Periodontitis and inflammation: a clinical and biological approach to the role of B cells.

**Keywords:** periodontitis, B cells, immunotherapies

**Abstract:** Periodontitis is an immunoinflammatory pathologie, leading to periodontal destruction, following the interaction between a dysbiotic biofilm and a deregulated immune response. Periodontitis and rheumatoid arthritis exhibit common immunopathogenic mechanisms. Thus, B cells have a major role in the etiopathogenesis of these two diseases. We conducted two observational clinical studies in cohorts of patients with periodontitis and treated for rheumatoid arthritis with two immunotherapies for B cells: an anti-IL-6R (Tolicizumab) and an anti-CD20 (Rituximab). The use of anti-IL-6R showed a decrease in TNF- $\alpha$  in gingival crevicular fluid after 6 months of treatment, without clinical change in the periodontitis.

On the other hand, the anti-CD20, responsible for a depletion in B cells, allowed an improvement of the periodontal clinical parameters. Then we studied the B cells phenotype in the blood and gingiva of patients with severe periodontitis. Our results show an increase in effector "switched memory" B cells and a decrease in regulator CD11b<sup>+</sup> B1 cells.

Our work has provided a better understanding of the distribution and role of B cells in the immune response in periodontitis, both locally and systemically, and the discussion opens many research approaches and new therapeutic strategies.