



**HAL**  
open science

# Cartographie du microbiote oral et identification de pathogènes oraux associés à la maladie d'Alzheimer

Leslie Borsa

► **To cite this version:**

Leslie Borsa. Cartographie du microbiote oral et identification de pathogènes oraux associés à la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6010 . tel-03889883

**HAL Id: tel-03889883**

**<https://theses.hal.science/tel-03889883>**

Submitted on 8 Dec 2022

**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.

# THÈSE DE DOCTORAT

## Cartographie du microbiote oral et identification de pathogènes oraux associés à la maladie d'Alzheimer

Oral microbiology in Alzheimer's patients (Acronyme  
ORAMICAL)

**Leslie BORSA**

Laboratoire MICORALIS UPR 7354

**Présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur en Sciences de la Vie et  
de la Santé  
d'Université Côte d'Azur**

**Dirigée par :** Alain Doglio / Laurence Lupi

**Soutenue le :** 20 avril 2022

**Devant le jury, composé de :**

Alain Doglio, MCU-PH, Université Côte d'Azur

Laurence Lupi, PU-PH, Université Côte d'Azur

Anne-Marie Musset, PU-PH, Université de  
Strasbourg

Jean-Noël Vergnes, PU-PH, Université

Toulouse III Paul Sabatier

Isabelle Bereder, PH, Centre Hospitalier  
Universitaire



# **Cartographie du microbiote oral et identification de pathogènes oraux associés à la maladie d'Alzheimer**

## **Oral microbiology in Alzheimer's patients (Acronyme: ORAMICAL)**

### **Jury**

#### **Président du Jury**

Anne-Marie Musset, PU-PH, Université de Strasbourg, INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), FMST

#### **Rapporteurs**

Anne-Marie Musset, PU-PH, Université de Strasbourg, INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), FMST

Jean-Noël Vergnes, PU-PH, Université Toulouse III Paul Sabatier, Laboratoire CERPOP, UMR1295, unité mixte INSERM - Université Toulouse III Paul Sabatier, Axe MAINTAIN - MAintain Functions and INTrinsec capacities with Aging : Preventive and Personalized INterventional Research

#### **Directeur**

Alain Doglio, MCU-PH, Université Côte d'Azur, Laboratoire MICORALIS (Microbiologie Orale, Immunothérapie et Santé), SVS

#### **Invité**

Isabelle Bereder, PH, Centre Hospitalier Universitaire de Nice

## Résumé : Cartographie du microbiote oral et identification de pathogènes oraux associés à la maladie d'Alzheimer (ORAMICAL : Oral microbiology in Alzheimer's patients)

L'incidence de la maladie d'Alzheimer (MA), qui constitue la première cause de troubles neurocognitifs dans la population adulte, augmente dans le monde entier. A ce jour, et malgré les immenses progrès réalisés en 30 ans concernant la compréhension des mécanismes neuropathologiques, et notamment l'accumulation des protéines Tau et Béta-amyloïdes, la question de l'étiopathogénie et des différents facteurs de risque de la MA reste largement débattue. Parmi les facteurs de risque étudiés, l'inflammation chronique et les pathologies, notamment infectieuses, constituent des voies de recherche particulièrement intéressantes.

Les données récentes de la littérature mettent en évidence un lien significatif entre les maladies parodontales et la MA. La cavité buccale héberge en effet un microbiote varié qui constitue un réservoir inflammatoire permanent favorisant la dissémination systémique d'espèces bactériennes, fongiques et virales. Plusieurs agents infectieux sont suspectés de jouer un rôle étiologique dans la genèse inflammatoire et l'aggravation des maladies neurodégénératives, dont la MA ; notamment les Herpes virus humains (HHV) et de nombreuses bactéries parodontopathogènes. Des agents pathogènes parodontaux majeurs ont en effet été détectés dans les lésions cérébrales de patients décédés et atteints de MA, suggérant une connexion infectieuse et inflammatoire entre la sphère oro-pharyngée et le cerveau.

Ce travail de thèse part ainsi du postulat que la cavité buccale représente un espace d'observation privilégié. L'étude ORAMICAL "Oral Microbiology in Alzheimer's patients" est une étude cas-témoins non randomisée conduite au CHU de Nice (CHUN). Elle vise à étudier, au niveau parodontal, la présence d'un ensemble sélectionné d'espèces bactériennes et virales chez des personnes âgées de plus de 70 ans, diagnostiquées ou non pour la MA. L'objectif principal est d'établir une signature parodontale, associant virus et bactéries, qui serait significativement associée à la MA. Les objectifs secondaires sont de comparer l'hygiène et l'état bucco-dentaires dans chaque groupe de patients.

Les cas et les témoins, ont été recrutés lors d'une consultation dentaire ou à la suite d'une consultation avec un gériatre au CHUN. Les échantillons parodontaux ont été collectés par un écouvillonnage oral réalisé sur la dent présentant la poche parodontale la plus profonde. Les ADN microbiens (11 au total, 7 virus et 4 bactéries) ont été analysés par qPCR. Différentes données cliniques, telles que le coefficient masticatoire, la présence de mobilités, l'indice carieux ou la mesure du statut parodontal ont également été recueillies. Ce protocole d'étude est rapporté selon les Standard Protocol Items : Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT). Les directives de l'étude STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) ont été suivies.

Une première phase de faisabilité a porté sur une vingtaine de patients, 13 cas et 11 témoins, ne présentant pas de différences significatives en âge et en sexe. L'état bucco-dentaire était significativement dégradé pour les cas. L'indice de plaque était significativement plus important chez les patients atteints de MA que chez les témoins, et leur niveau de dépendance était également significativement plus important. Cette étude met en évidence la présence marquée de certaines espèces bactériennes et virales dans les lésions parodontales des patients atteints de MA. Les différences (Fisher exact test) concernent le virus Varicelle-Zona (VZV), le virus Epstein-Barr (EBV), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) et *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) qui sont détectés de manière très significative chez les cas. Bien que basée sur un nombre de participants encore modeste, cette étude met en évidence pour la première fois l'incidence accrue du VZV au niveau oral, associé à des marqueurs plus consensuels des dysbioses parodontales comme EBV, *Pg* et *Fn*.

**Mots clés :** maladie d'Alzheimer (MA), parodontite, maladie parodontale, microbiote oral, Herpès virus, cytomégalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV), virus de la varicelle et du zona (VZV), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*)

**Abstract : Mapping the oral microbiota and identifying oral pathogens associated with Alzheimer's disease (ORAMICAL: Oral Microbiology in Alzheimer's patients)**

The incidence of Alzheimer's disease (AD), the leading cause of neurocognitive disorders in the adult population, is increasing worldwide. To date, and despite the immense progress made over the last 30 years in understanding the neuropathological mechanisms, and in particular the accumulation of Tau and Beta-amyloid proteins, the question of the etiopathogeny and the various risk factors of AD remains widely debated. Among the risk factors studied, chronic inflammation and pathologies, particularly infectious ones, constitute particularly interesting avenues of research.

Recent data from the literature show a significant link between periodontal disease and AD. The oral cavity harbours a varied microbiota which constitutes a permanent inflammatory reservoir favouring the systemic dissemination of bacterial, fungal and viral species. Several infectious agents are suspected of playing an etiological role in the inflammatory genesis and aggravation of neurodegenerative diseases, including AD; in particular, human herpes viruses (HHV) and numerous periodontopathogenic bacteria. Major periodontal pathogens have been detected in the brain lesions of deceased AD patients, suggesting an infectious and inflammatory connection between the oropharyngeal sphere and the brain.

This thesis work is based on the assumption that the oral cavity represents a privileged observation space. The ORAMICAL study "Oral Microbiology in Alzheimer's patients" is a non-randomised case-control study conducted at the Nice University Hospital (NUH). It aims to study, at the periodontal level, the presence of a selected set of bacterial and viral species in people aged over 70 years, diagnosed or not with AD. The primary objective is to establish a periodontal signature, combining viruses and bacteria, that would be significantly associated with AD. The secondary objectives are to compare oral hygiene and oral status in each group of patients.

Cases and controls were recruited during a dental consultation or following a consultation with a geriatrician at the NUH. Periodontal samples were collected by oral swabbing of the tooth with the deepest periodontal pocket. Microbial DNA (11 in total, 7 viruses and 4 bacteria) was analysed by qPCR. Various clinical data, such as masticatory coefficient, presence of mobility, caries index or periodontal status measurement were also collected. This study protocol is reported according to the Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT). The STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) study guidelines were followed.

A first feasibility phase was carried out on twenty patients, 13 cases and 11 controls, with no significant differences in age and sex. The oral status was significantly worse for the cases. The plaque index was significantly higher in AD patients than in controls, and their level of dependency was also significantly higher. This study highlights the marked presence of certain bacterial and viral species in the periodontal lesions of AD patients. The differences (Fisher exact test) concern Varicella-Zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), which are detected to a high degree of significance in the cases. Although still based on a modest number of participants, this study highlights for the first time the increased incidence of VZV at the oral level, associated with more consensual markers of periodontal dysbiosis like EBV, *Pg* and *Fn*.

**Keywords:** Alzheimer's disease (AD), periodontitis, periodontal disease, oral microbiota, herpes virus, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), varicella zoster virus (VZV), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*)

**Unité de Recherche:**

Laboratoire MICORALIS (Microbiologie orale, Immunothérapie et Santé) - UPR 7354  
Université Côte d'Azur, Campus St Jean d'Angély-SJ2, Faculté de chirurgie-dentaire odontologie  
5 rue du 22<sup>e</sup> B.C.A. 06300 Nice

## Remerciements

Ce travail de thèse est l'occasion de remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont accompagnée sur le chemin ...

MERCI !

Aux membres de mon jury, merci d'avoir accepté de juger ce travail et de partager avec nous votre expertise.

Au Dr Carrouel et au Dr Mari, qui ont été bienveillants et de très bon conseil.

Laurence, merci pour tout. Merci pour ton soutien, pour ta confiance, ta bienveillance et ta bonne humeur sans failles. Je sais que je suis chanceuse d'être dans ton équipe !

Alain, merci pour votre aide et vos conseils, qui m'ont été indispensables dans ce travail. Vous m'avez épaulée et initiée à la microbiologie orale, toute une aventure pour moi !

A l'ensemble de l'équipe MICORALIS, à Marlène, Lilit, Morgane, Robert, Margaux, Julie, je suis tellement heureuse de vous avoir rencontrés ! Merci pour votre soutien, votre patience et votre disponibilité, sans vous ce travail n'aurait pas été le même.

Au Dr Sacco et au Dr Michel pour leur aide précieuse, à toute l'équipe du pôle R.A.V., et à ma petite Françoise.

A ma fille, l'amour de ma vie, mon bébé, Aline .

A grands-parents Aline, Emile et Americo, qui j'en suis sûre veillent sur moi d'où ils sont. Votre présence et votre amour me manquent, mais l'enfance tellement heureuse que j'ai eue à vos côtés a été le plus beau des cadeaux. Je vous aime.

A mes parents pour leur amour et leur soutien sans faille. Je suis consciente de la chance que j'ai de vous avoir. Merci pour tout ce que vous m'apportez. Même si je ne le dis pas assez souvent, vous êtes mes parents adorés et je vous aime du fond du cœur.

A mon frère.

A mon aide opératoire, mon côté lumineux, mon âme sœur, Arnaud.

A mes best depuis toujours, mes bichettes, Marjo, Cé, Do, Mymy, Gwen.

A ma nouvelle best, ma vilaine, Elody.

A ma famille éloignée (le Var c'est déjà trop loin, alors Paris, quelle idée ...), Livia, Albane, Julie, Alex, Olivier, Izia, Samuel, Marie, Michel, Michèle, Jean-Réné, Flo, Ludo, Marie-Caroline, Romain et bébé Louis !

A ma nièce et ma belle-famille.

A toute l'équipe de la faculté d'odontologie de Nice et à celle du pôle odontologie du C.H.U. de Nice, et aux étudiants.

A ceux que j'oublie (et j'en suis désolée) mais qui en fait comptent beaucoup 😊

<b>VALORISATION.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>PARTIE 1 : LA MALADIE D'ALZHEIMER.....</b>	<b>13</b>
<b>A. Généralités.....</b>	<b>13</b>
1. Définition.....	13
2. Prévalence et coûts.....	13
3. Facteurs de risque.....	14
<b>B. Diagnostic et traitements.....</b>	<b>15</b>
1. Diagnostic.....	15
2. Traitements.....	16
<b>C. Mécanismes neuropathologiques.....</b>	<b>18</b>
1. Plaques amyloïdes.....	18
2. Hyperphosphorylation de la protéine Tau.....	19
<b>PARTIE 2 : LA MALADIE PARODONTALE.....</b>	<b>21</b>
<b>A. Généralités.....</b>	<b>21</b>
1. Définitions et anatomie.....	21
2. Prévalence.....	21
3. Facteurs de risque.....	22
<b>B. Classifications des maladies parodontales.....</b>	<b>23</b>
1. Historique.....	23
2. Classification de Chicago 2017.....	24
2.1. Santé parodontale (60).....	24
2.2. Gingivites induites par la plaque.....	24
2.3. Gingivites non induites par la plaque.....	25
2.4. Parodontites.....	25
<b>C. Microbiote parodontal.....</b>	<b>26</b>
1. Formation du biofilm.....	26
2. Flore gingivale.....	27
2.1 Flore supra-gingivale (65).....	27
2.2 Flore infra-gingivale (66,67).....	27
<b>D. Prévention et traitements.....</b>	<b>29</b>
<b>E. Santé parodontale et santé générale.....</b>	<b>30</b>
<b>F. Maladies parodontales et maladie d'Alzheimer.....</b>	<b>31</b>
<b>PARTIE 3 : SANTE ORALE, MICROBIOLOGIE ORALE ET MALADIE D'ALZHEIMER.....</b>	<b>32</b>
<b>Article 1. Revue Systématique de la littérature.....</b>	<b>36</b>
<b>PARTIE 4 : IMPLICATION DES HERPES VIRUS ORAUX DANS LA PATHOGENESE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....</b>	<b>57</b>
<b>A. Classification des HHV.....</b>	<b>57</b>



<b>B. Données générales sur les HHV.....</b>	<b>58</b>
1. HSV-1 et HSV-2 .....	58
2. HHV3 ou VZV .....	59
3. HHV4 ou EBV .....	59
4. HHV5 ou CMV.....	60
5. HHV6A et 6B et HHV7 (133) .....	60
6. HHV8 ou KSHV (136) .....	61
<b>C. Herpès virus, cavité orale et maladie d'Alzheimer.....</b>	<b>61</b>
1. Herpès virus et maladies parodontales.....	61
2. Herpès virus et maladie d'Alzheimer .....	63
<b><i>PARTIE 5 : VERS UNE ASSOCIATION ENTRE VZV ET EBV et ALZHEIMER ? (ETUDE ORAMICAL)</i></b>	<b><i>68</i></b>
<b><i>.....</i></b>	<b><i>68</i></b>
<b>A. Etude de faisabilité .....</b>	<b>68</b>
1. Collection d'échantillons (laboratoire MICORALIS) .....	68
2. Protocole de recherche .....	68
3. Résultats.....	71
<b>Article 2. Résultats préliminaires .....</b>	<b>73</b>
<b>B. Etude ORAMICAL .....</b>	<b>115</b>
<b>Article 3. Protocole ORAMICAL .....</b>	<b>117</b>
<b><i>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</i></b>	<b><i>150</i></b>
<b>A. Données des études in vitro et chez l'animal .....</b>	<b>150</b>
<b>B. Données des études sur échantillons de cerveaux post-mortem.....</b>	<b>150</b>
<b>C. Donnés des études chez l'homme .....</b>	<b>151</b>
<b>D. Perspectives de prévention et de traitement.....</b>	<b>152</b>
<b><i>ANNEXES .....</i></b>	<b><i>171</i></b>

## VALORISATION

### Publications scientifiques

-**Article 1** : Borsa L, Dubois M, Sacco G, Lupi L, Analysis the Link between Periodontal Diseases and Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Int J Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 9312. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179312>. (IF: 3.390)

-**Article 2** : Borsa L, Vincent-Bugnas S, Sacco G, Chevalier M, Tonoyan L, Ortis M, Lupi L, Doglio A, Periodontal microbiota in elderly people diagnosed with Alzheimer's disease: a case-control study (ORAMICAL: Oral Microbiology in Alzheimer's patients) soumis à la date de la thèse

-**Article 3** : Borsa L, Vincent-Bugnas S, Sacco G, Carrouel F, Chevalier M, Tramini P, Lupi L, Doglio A, Periodontal microbiota in elderly people diagnosed with Alzheimer's disease: a case-control study protocol (ORAMICAL: Oral microbiology in Alzheimer's patients) – soumis dans *Methods and Protocols*, Manuscript ID: mps-1652289. (9 march 2022)

### Valorisations en congrès

BORSA L, VINCENT-BUGNAS S, SACCO G, DOGLIO A, LUPI L, Cartographie du microbiote oral et identification de pathogènes oraux associés à la maladie d'Alzheimer.

Collège national des Chirurgiens-Dentistes Universitaires en Santé Publique, à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Reims, Octobre 2021.

Prix Colgate de la communication orale, département Affaires scientifiques Colgate, Comité CNCDUSP

### Contrat de recherche

Le projet a été proposé en RIPH de catégorie 2 lors de la session 2021 des Appels à projets internes du CHU de Nice et a été retenu (notification reçue le 02/04/2021) pour un financement de 9895 €.

### LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de la maladie d'Alzheimer (27)

Figure 2 : Prévalence de la maladie d'Alzheimer en fonction des catégories d'âges (27)

Figure 3 : Coût des démences dans le monde (28)

Figure 4 : Formation des plaques amyloïdes (1) (41)

Figure 5 : Formation des plaques amyloïdes (2) (41)

Figure 6 : Formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (27)

Figure 7 : Mécanismes neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer

Figure 8 : Les structures parodontales (11)

Figure 9 : Les différents complexes bactériens (69)

Figure 10 : Evolution de la composition du biofilm sous gingival (69)

Figure 11 : Les PAMPs de *Porphyromonas gingivalis* (63)

Figure 12 : Lien entre bactéries parodontales et santé générale (78)

Figure 13 : Déroulement des infections à herpèsvirus (109)

### LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Prévalence et incidence de la maladie d'Alzheimer en Europe (26)

Tableau 2 : Résumé des facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer (6)

Tableau 3 : Prévalence des maladies parodontales en fonction de la classification choisie (7)

Tableau 4 : Classification (simplifiée) des maladies parodontales d'après Armitage, 1999 (58)

Tableau 5 : Récapitulatif des signes cliniques et radiographiques de la gingivite (49)

Tableau 6 : Critères des stades et des grades de la classification des parodontites (49)

Tableau 7 : Calcul du volume de mix à préparer pour une analyse par qPCR classique en duplicat

Tableau 8 : Calcul du volume de mix à préparer pour une analyse par qPCR classique en triplicat

## LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 : Note d'information destinée au représentant légal/tuteur
- Annexe 2 : Non-opposition du représentant légal/tuteur pour son proche
- Annexe 3 : Note d'information destinée au patient
- Annexe 4 : Non-opposition du patient
- Annexe 5 : Budget du projet Oramical

## LISTE DES ABREVIATIONS

- Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- ADL: Activities of daily living
- ADAS-Cog : Alzheimer's Disease Assessment Scales (cognition)
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AICD: APP Intracellular Domain
- An*: *Actinomyces naeslundii*
- AOI : Appel d'Offre Interne
- APoE: Apolipoprotéine E
- APP: Protéine précurseur de l'amyloïde
- ARN : Acide ribonucléique
- AVC: Accident vasculaire cérébral
- CDC-AAP: Center for Disease Control and Prevention and the American Academy of Periodontology
- CHUN : Centre Hospitalier Universitaire de Nice
- CIM-10: Classification internationale des maladies - version 10
- CIM-11: Classification internationale des maladies - version 11
- CMV : Cytomégalovirus
- CNIL : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
- CPP : Comité de Protection des Personnes
- Cr*: *Campylobacter rectus*
- DSM-V: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition
- EFP: European Federation of Periodontology
- EBV: Virus Epstein-Barr
- FDA: Food and Drug Administration
- FDI : Fédération Dentaire Internationale
- Fn*: *Fusobacterium nucleatum*
- HAS: Haute Autorité de Santé
- HHV: Herpes virus humain/Human Herpes Virus
- HSV: Herpes Simplex Virus
- HZ : Herpes Zoster, communément appelé zona (p.73)
- IADL: Instrumental activities of daily living
- IC 95%: Intervalle de confiance à 95%
- Ig : Immunoglobuline
- IL : Interleukine
- IRM: Imagerie par résonance magnétique
- KSHV: Herpes virus associé au sarcome de Kaposi/Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus
- LCR: liquide céphalo rachidien
- LPS: Lipopolysaccharide
- MA : Maladie d'Alzheimer
- MCI: Mild Cognitive Impairment
- MMSE: Mini Mental State Examination
- MNI : Mononucléose infectieuse
- MP: Maladies parodontales
- MR : Méthodologie de référence
- NINCDS-ADRDA : National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
- NMDA: *N*-méthyl-D-aspartate

OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
*Pg*: *Porphyromonas gingivalis*  
*Pi* : *Prevotella intermedia*  
PUN: Parodontite ulcéro-nécrotique  
qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction  
RT-PCR : Polymérase en temps réel/ Real-Time Polymerase Chain Reaction  
SBD : Santé bucco-dentaire  
SEP : Sclérose en plaques  
SNC: Système nerveux central  
SIDA : Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise  
*Td*: *Treponema denticola*  
TEP: Tomographie par émission de positons  
*Tf*: *Tannerella forsythia*  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
UCDA : Université Nice Côte d'Azur  
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine  
VZV : Virus de la varicelle et du zona/Varicella Zoster Virus

## INTRODUCTION

La maladie d'Alzheimer (MA) constitue la première cause de trouble neurocognitif dans la population adulte. A ce jour près de 47 millions de personnes sont affectées dans le monde (1) dont environ 1 million en France (2), et le coût annuel estimé dans le monde a dépassé les 1 000 Milliards de dollars US (1). De plus, la conférence de consensus international pour le « Global Burden of Disease Report », a classé l'incapacité liée aux troubles neurocognitifs comme étant la plus invalidante comparativement à toutes les autres pathologies, exception faite des troubles neuro-développementaux sévères (3). A ce jour, et malgré d'immenses progrès réalisés en 30 ans sur la compréhension des mécanismes neuropathologiques, notamment en ce qui concerne le rôle de la protéine Tau et des peptides bêta-amyloïdes (4), la question de l'étiopathogénie et des facteurs de risque tels que l'avancée en âge, les facteurs génétiques ou environnementaux reste à ce jour largement débattue (5,6). Parmi les facteurs de risque étudiés, la MA est significativement associée à la santé orale et notamment aux maladies parodontales. En effet, la santé bucco-dentaire est le reflet souvent fidèle de la santé générale et le lien avec plus d'une cinquantaine de maladies systémiques, comprenant les maladies cardio-vasculaires et pulmonaires, le diabète et certaines formes de cancers est désormais établi (7,8,9,10). Cela est notamment aussi le cas pour la MA dans la mesure où les données les plus récentes mettent en évidence un lien significatif entre les maladies parodontales et la MA (11-16). La parodontite est une maladie inflammatoire chronique, très fréquente, dont l'étiologie principale est de nature infectieuse. Principalement, des modifications microbiologiques du biofilm gingival (dysbiose) sont responsables de la pathologie; en particulier, l'émergence de bactéries anaérobies, telles que *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), ou la multiplication de virus du groupe des Herpès Virus humains (HHV). Le lien entre l'inflammation parodontale et la MA, qui comporte elle aussi une forte composante inflammatoire, pourrait notamment s'expliquer par la diffusion d'agents infectieux, ou inflammatoires, migrant depuis la cavité orale vers le cerveau (11,14,15,16).

Il est aujourd'hui bien établi que la neuroinflammation, due à l'activation des cellules immunitaires du cerveau, joue un rôle majeur dans la progression de la MA. Il est établi que l'interaction entre neuroinflammation et formation de plaques bêta-amyloïdes constitue l'élément majeur responsable de la propagation de la protéine tau et donc les lésions neurologiques (17). Les causes de la neuroinflammation restent encore mal connues, cependant les résultats de plusieurs études suggèrent de plusieurs agents pathogènes, incluant des virus et des bactéries, pourraient être des « inducteurs » à l'origine de l'inflammation neuronale (18). En particulier, des travaux récents mettent en évidence la présence d'agents infectieux oraux dans les tissus lésionnels du cerveau de patients décédés de la MA (19). L'incursion microbiologique dans le système nerveux central (SNC) pourrait s'effectuer soit via la voie orale-nasale-olfactive soit par le biais des leucocytes circulants. Selon Miklossy, J. & McGeer (20) une densité sept fois plus élevée de bactéries orales est retrouvée dans les tissus cérébraux de patients décédés et atteints de MA par rapport à la normale. En effet, les bactéries les plus fréquemment

retrouvées dans les lésions cérébrales sont majoritairement des bactéries orales. L'hypothèse principale qui sous-tend ce projet est donc que la dysbiose orale pourrait jouer un rôle aggravant l'inflammation à distance, notamment celle des tissus neuronaux. Dans ce contexte, il est aussi intéressant de constater que l'évolution péjorative de la microbiologie orale est en lien avec l'obésité (21) et le diabète de type 2 (22), chacune de ces pathologies étant par ailleurs fortement associée à MA. Ce travail de thèse s'inscrit par conséquent dans ce contexte et pose la question du rôle des microorganismes buccaux dans la genèse de la MA ?

Les éléments rationnels qui supportent la réalisation de ce travail seront développés dans les paragraphes qui suivent, ils concernent tout particulièrement :

- i) le lien, aujourd'hui bien établi, entre MA et santé orale, tout particulièrement concernant les maladies parodontales.
- ii) le rôle péjoratif des dysbioses microbiennes orales en santé orale et leur conséquences inflammatoires.
- iii) la présence de pathogènes oraux (bactériens, viraux, fongiques) détectés post-mortem dans les sites neuronaux inflammatoires caractéristiques de la MA.

L'objectif principal de notre travail est d'identifier des pathogènes parodontaux (bactériens et viraux) qui pourraient être significativement associés au développement de la MA. Cette identification devrait aboutir à la proposition de une ou plusieurs signatures microbiologiques significatives de la flore infectieuse parodontale de la personne âgée atteinte de MA. En complément, l'étude de paramètres secondaires permettra rattacher les prélèvements microbiologiques à un contexte de santé orale. Les objectifs secondaires seront ainsi de comparer l'état bucco-dentaire, l'état parodontal et le niveau d'hygiène buccale des patients atteints de MA et des sujets témoins. La réalisation de ce projet repose sur une étude clinique permettant de générer une collection de prélèvements d'échantillons parodontaux de patients atteints de MA et de patients appariés non atteints. Les résultats de l'analyse moléculaire des prélèvements d'une première cohorte de patients sont présentés dans ce mémoire.

La première partie de cette thèse présente des rappels à propos de la MA et de la parodontite afin de fournir au lecteur les bases cliniques et mécanistiques permettant de mieux comprendre ces maladies. Dans une seconde partie, nous ferons le point des connaissances actuelles concernant les liens entre santé orale, microbiologie orale et MA. Dans ce contexte, nous présentons une revue de la littérature sur le thème du lien entre maladie parodontale (MP) et MA, publiée en septembre 2021 dans la revue IJERPH (Borsa et al, 2021). Enfin, nous concluons en établissant un focus tout particulier concernant le rôle des HHV oraux en pathogénèse orale et la proposition d'une incidence sur la sphère neurologique. Dans ce contexte, nous présentons les premiers résultats que nous avons obtenus dans le cadre de l'étude clinique en cours (article soumis avant la soutenance), ainsi que le protocole d'une étude de plus grande envergure (article soumis).

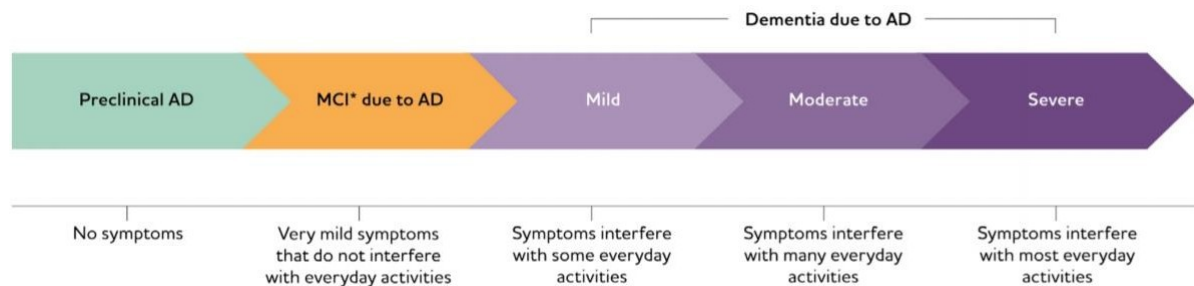
## PARTIE 1 : LA MALADIE D'ALZHEIMER

### A. Généralités

#### 1. Définition

La MA est une maladie neurodégénérative d'évolution lente. Elle est caractérisée par l'atrophie et la perte des neurones et débute dans la région de l'hippocampe (16,23). Les débuts de la maladie sont asymptomatiques. Cette phase pré-clinique est souvent longue et ne peut être diagnostiquée que par l'imagerie médicale et la biologie. Ensuite, elle évolue vers une forme prodromale, pré-démontielle, appelée en anglais Mild Cognitive Impairment (MCI) qui possède des signes cliniques présents mais discrets. Le stade avéré de la MA se caractérise quant à lui par une déficience cognitive importante.

La MA est ainsi classée selon 3 stades : faible; modérée; sévère (24) (Figure 1).



**Figure 1:** Evolution de la maladie d'Alzheimer (27)

Il existe deux formes de MA. La première est déterminée génétiquement et affecte des patients de moins de 65 ans. Plus couramment, elle prend le nom de « maladie d'Alzheimer jeune ». L'objectif de ce travail étant de cibler les formes non génétiques, elle ne sera pas évoquée. La deuxième forme n'est pas déterminée génétiquement et est multifactorielle. Elle touche des patients plus âgés, avec une moyenne d'âge de 65 ans ou plus. C'est la forme la plus courante, qui regroupe environ 95 % des cas (25).

#### 2. Prévalence et coûts

La MA constitue la première cause de trouble neurocognitif dans la population adulte. A ce jour près de 50 millions de personnes sont affectées dans le monde par cette maladie dont plus d'1 million en France. Le coût annuel estimé dans le monde a dépassé 1000 milliards de dollars US (1), et le handicap lié aux troubles neurocognitifs a été estimé comme le plus important par rapport à toutes les autres pathologies, à l'exception des troubles neuro-développementaux sévères (2).

L'étude de H. Niu (26) menée en 2017 estime la prévalence de la MA en Europe à 5,05 % (intervalle de confiance à 95% [IC 95%] : 4,73-5,39) tout sexes confondus. Elle est deux fois plus importante chez la femme (7,13% ([IC 95%] : 6,56-7,72)) que chez l'homme (3,31% ([IC 95%] : 2,85-3,80)). L'incidence

de la maladie en Europe est de 11,08 pour 1.000 personnes par an ([IC 95%] : 10,30-11,89), et est également supérieure chez la femme (tableau 1).

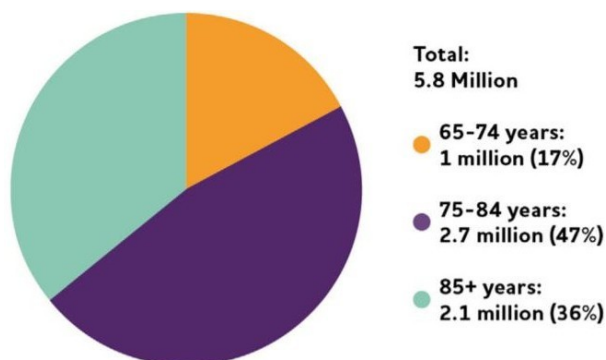
**Tableau 1 : Prévalence et incidence de la maladie d'Alzheimer en Europe (26)**

	Sexes confondus	Femmes	Homme
<b>Prévalence de la MA</b>	5,05 % [IC 95%] : 4,73-5,39	7,13% [IC 95%] : 6,56-7,72	3,31% [IC 95%] : 2,85-3,80
<b>Incidence de la MA</b>	11,08 pour 1000pers/an [IC 95%] : 10,30-11,89	13.25 pour 1000pers/an [IC 95%] : 12,05-14,51	7.02 pour 1000pers/an [IC 95%] : 6,06-8,05

### 3. Facteurs de risque

L'étiologie de la MA demeure encore mal connue. En ce sens, la recherche de facteurs de risques est un enjeu majeur afin de tenter de comprendre, prévenir et ralentir le développement de la maladie.

Tout d'abord, l'âge est l'un des facteurs de risque les plus importants (7, 27). Plus l'âge augmente, plus le risque de développer la MA augmente (figure 2). La moyenne d'âge des personnes atteintes de la MA est de 65 ans ou plus (27).



**Figure 2: Prévalence de la maladie d'Alzheimer en fonction des catégories d'âges (27)**

Les femmes sont plus atteintes de la MA que les hommes (27,28). Cependant, il semblerait que ce facteur soit la conséquence de facteurs indirects tels l'éducation ou l'espérance de vie. En effet, les femmes vivent plus longtemps que les hommes, mais avec plus de problèmes de santé (29). Ces facteurs sont à approfondir afin de pouvoir confirmer un lien entre le genre et la MA (27).

Par ailleurs, la présence de l'allèle ε4 au locus de l'apolipoprotéine E (ApoE) sur le chromosome 19 est un facteur de risque de la maladie. Il augmente le risque de la développer et contribue à l'apparition précoce des symptômes. Il est également impliqué dans sa progression. Cela est encore plus important chez les patients homozygotes pour cet allèle (7,25,27).

La MA est multifactorielle et a été associée à des facteurs de risques modifiables, issus de notre environnement. Reconnaître ces facteurs de risques est un enjeu capital pour prévenir ou du moins retarder l'apparition de la maladie (48). Un niveau bas d'éducation, peu d'exercice physique régulier, la



présence de facteurs de risques cardiovasculaires, des antécédents de traumatismes cérébraux, des facteurs de risques liés à la nutrition, l'immunité, la fonction mitochondriale ainsi que les infections sont corrélés avec une augmentation du risque de développer cette maladie (7,27) (Tableau 2).

**Tableau 2 : Résumé des facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer (6)**

Grouping	Risk factor	Grouping	Risk factor
Demographic	Age [43,78,76]	Medical	Malnutrition [1,76,189]
	Education [76,92]		Poor diet [65,167,168,176,196]
	Gender [76]		Smoking [37,76,173]
	Race [76]		Cancer [173]
	Social class [76]		Cardiovascular disease [76,95,116]
Genetics	Amyloid precursor protein (APP) [39,58]*	Congestive heart failure [76,81]	
	Presenilin 1 and 2 (PSEN1/2) [112,170]*	Immune system dysfunction [12,128,141,158]	
	Apolipoprotein E (APOE) [110,166,181]	Micro-infarcts [27]	
	ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) [105]	Obesity [31,71,125,185]	
	Adaptor protein evolutionarily conserved signalling intermediate in Toll pathway (ECSIT) [175]	Poor cholesterol homeostasis [110]	
	Clusterin gene (CLU) [150]	Poorly controlled type-2 diabetes [4,118,124]	
	Estrogen receptor gene (ESR) [162]	Stroke [203]	
	Fermitin family homolog 2 gene (FERMT2) [38]	Traumatic brain injury (TBI) [53,76,80,93,129,130,131,139,169]	
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [5]	Psychiatric	Depression [50,21]
	Histocompatibility locus antigen (HLA class III) [40,77,190]		Early stress [82,148]
	mtDNA haplotype [165]	Environmental	Air pollution [101]
	Transferrin gene (Tf) [194]		Calcium deficiency [76]
	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM 2) [161]		Geographic location [76]
	Vascular protein sorting-10 domain (VPS10) genes [108]		Metals (especially aluminium, copper, zinc) [16,86,147,156]
	Vitamin D receptor gene (VDR) [193]		Military service [60]
Epigenetic factors [106,107]	Organic solvents [76]		
Lifestyle	Alcohol [65]		Occupation [101,147]
	Lack of exercise [76,102,152]	Vitamin deficiency [68,126,139]	
	Lack of cognitive activity [92,174]	Infection	Bacteria, e.g. <i>Chlamydomphila pneumonia</i> , <i>Treponema</i> [19,55,133]
	Dental infections [159]		
	Fungi [7]		
	Viruses [114,164,197]		

## B. Diagnostic et traitements

### 1. Diagnostic

Le diagnostic de MA est souvent effectué en raison de symptômes cliniques (30). Le patient de plainte de certaines altérations de son état et vient ainsi consulter. Il s'agit initialement d'un diagnostic d'exclusion d'autres pathologies telles que la démence à corps de Lewy diffus, la démence fronto-temporale ou encore la présence de tumeurs cérébrales (27,31).

Un diagnostic de MA dit « possible » avec atteinte neurocognitive mineure sera établi selon différents critères, tels ceux de la Classification internationale des maladies - version 10 (CIM-10 (32)) ou de la Classification internationale des maladies - version 11 (CIM-11 (33)) de l'OMS, ou ceux de l'« Institut national des troubles neurologiques et communicatifs et de l'AVC et Association de la maladie

d'Alzheimer et des troubles connexes » (en anglais, « National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association » [24], NINCDS-ADRDA (34)), ou encore sur les critères diagnostiques du « Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux » (en anglais, « Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition », DSM-V (35)), qui représente le test de référence. Ces tests permettent de différencier les différents troubles mentaux pour mieux les diagnostiquer (31). Les critères du DSM-V sont les plus utilisés. Ils reposent sur différents aspects tels qu'une évaluation cognitive (incluant une évaluation globale, le plus souvent avec le Mini Mental State Examination (MMSE), une évaluation fonctionnelle (échelles ADL Activities of Daily Living ou IADL Instrumental Activities of Daily Living), une évaluation comportementale, un examen clinique, et des examens para-cliniques. Le score MMSE permet d'évaluer rapidement et simplement les différentes fonctions neurologiques. La valeur seuil de ce test est communément de 24/30 mais peut varier selon le niveau de sensibilité et de spécificité recherché (36). L'obtention de ce score ou d'un score inférieur à la valeur seuil confirme la présence d'un trouble cognitif (31). Les tests cognitifs, fonctionnels et comportementaux sont complétés d'un bilan sanguin et d'une imagerie cérébrale pour conforter le diagnostic probable de la MA (27). Dans le cas d'un diagnostic dit « possible », ou pour les âges supérieurs à 80 ans, un test par biomarqueurs (à l'aide d'une ponction lombaire) n'est pas indiqué si les troubles sont majeurs ou flagrants, et la caractérisation sera également effectuée à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (37). Un diagnostic de MA dit « probable » avec atteinte neurocognitive majeure sera quant à lui établi après une analyse de biomarqueurs présents dans le sérum et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), par ponction lombaire. Cet examen sera requis dans des cas spécifiques ou atypiques, comme chez des patients jeunes. Une tomographie par émission de positons couplé à un scanner (imagerie TEP-scan) peut également être indiquée (30,31). Ces examens permettent de connaître les taux de protéines amyloïdes beta et de la protéine Tau dans le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou le cerveau, mais ne seront donc pas systématiquement utilisés en raison de leur caractère invasif et de leur coût (31). Un diagnostic de certitude ne peut être posé qu'après analyse histopathologique issue d'une biopsie du tissu cérébral, en postmortem. Il est principalement utilisé à visée scientifique (30).

## 2. Traitements

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif qui permette de guérir la maladie. Toutefois, un espoir vient d'un traitement ayant reçu une autorisation transitoire de mise sur le marché par la U.S. Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis en juin 2021. Il s'agit de l'Adulhem du laboratoire Biogen, qui utilise une molécule appelée aducanumab. Il est le premier du genre à cibler une des causes de la maladie elle-même, la présence de plaques bêta-amyloïdes dans le cerveau. Pourtant, l'efficacité de ce traitement injectable n'a pas été prouvée. Au contraire, deux essais cliniques auraient été stoppés en 2019 par manque d'effets de la molécule. Des effets indésirables tels que des lésions de la matière

blanche ont également été observés chez certains patients. La FDA a autorisé le traitement uniquement pour les personnes souffrant de formes légères et a demandé à Biogen de conduire un nouvel essai clinique pour vérifier les bénéfices cliniques du médicament. Les résultats confirmeront ou infirmeront l'autorisation. Il est à souligner que son prix est très cher et représente 46000€ par an et par patient. Ainsi, même en présence de résultats concluants, la coût du médicament pourrait demeurer un obstacle en l'absence d'un remboursement total ou partiel.

Les autres médicaments actuellement utilisés permettent d'atténuer les symptômes en augmentant la quantité de neurotransmetteurs dans le cerveau (27,30). Il s'agit de médicaments à visée symptomatique qui ne modifient pas l'évolution de la maladie. Bien que leur efficacité soit modeste et temporaire, elle a été scientifiquement établie. Seules quatre molécules sont actuellement disponibles (27). Elles peuvent être prescrits par un gériatre, un neurologue ou un psychiatre, mais leur prescription n'est pas automatique. Trois d'entre elles agissent comme des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Cesont le Donépézil, la Rivastigmine et la Galantamine. Elles sont utilisées dans la plupart des cas. La Memantine est un antiglutamate (antagoniste des récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA)). Cette classe thérapeutique a montré des résultats contradictoires sur les symptômes de la MA. Elle peut être utilisée en association avec le Donépézil. Elle est recommandée chez les patients atteints de démence modérée à sévère (31). Depuis 2016, la Haute Autorité de Santé (HAS) a procédé au déremboursement des médicaments « anti-Alzheimer ». Selon la HAS, la balance bénéfice/risque/coût n'était pas en faveur du remboursement par la collectivité de ces médicaments. Les patients se voyaient exposés à des effets indésirables jugés trop importants au vu de l'efficacité moyenne des traitements pour justifier une prise en charge par la sécurité sociale (38).

En complément des traitements médicamenteux, la stimulation cognitive, les thérapies cognitives et musicales permettent de diminuer l'apparition des troubles neuropsychiatriques et du comportement (30,39). De plus, les patients sont supplémentés en vitamines et acides gras pour tenter de contrer les facteurs de risques associés (27).

Du fait de l'invalidité entraînée par cette pathologie et des coûts qu'elle engendre, Il existe une réelle urgence à trouver des solutions pour soigner ou ralentir les différents types de démences. En effet et d'ici 2030, les dépenses inhérentes à leur prise en charge représenteront le PIB des Pays-Bas ou de l'Arabie Saoudite, soit 2 billions de dollars américains (28) (figure 3).



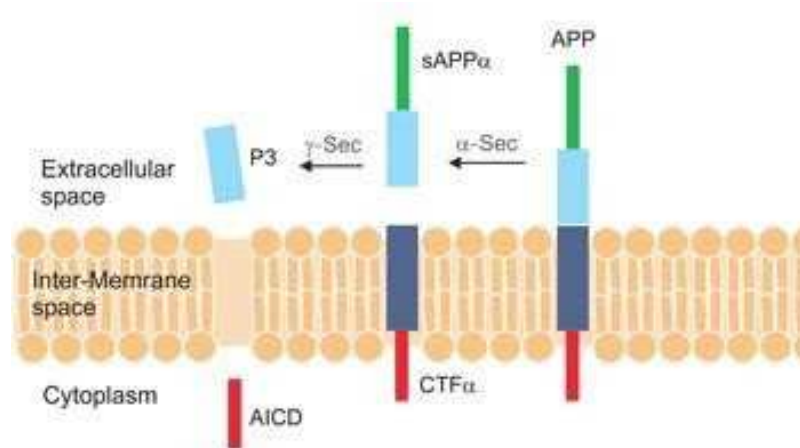
**Figure 3:** Coût des démences dans le monde (28)

### C. Mécanismes neuropathologiques

Les processus moléculaires étiopathogéniques les plus couramment évoqués au cours de la MA sont la présence de plaques amyloïdes et de protéines Tau hyperphosphorylées (25).

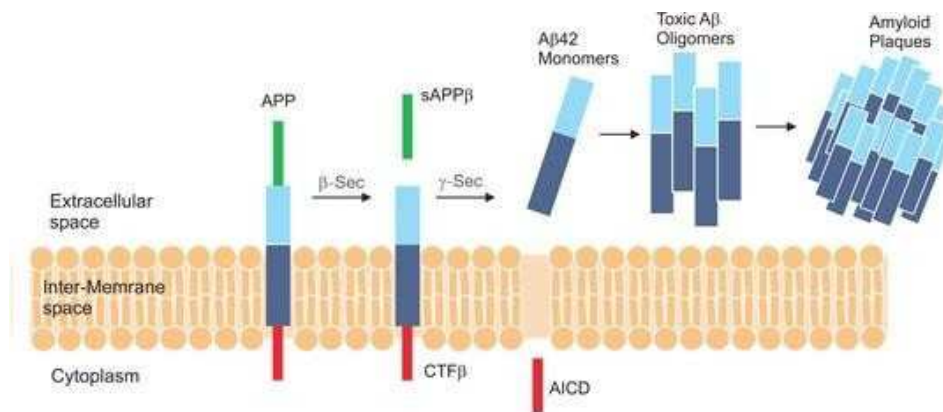
#### 1. Plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes sont issues du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) codée sur le chromosome 21 (40). La protéine précurseur de l'amyloïde est une glycoprotéine transmembranaire présente dans les neurones. Chez le sujet sain, elle va être clivée majoritairement par la protéase  $\alpha$  pour former le peptide circulant sAPP- $\alpha$  présent en extracellulaire. La protéase  $\gamma$  participe aussi au clivage de l'APP pour former le peptide circulant APP Intracellular Domain (AICD) en intracellulaire (figure 4). Le fragment sAPP- $\alpha$  ainsi que le fragment restant de la protéine APP sont solubles et facilement dégradables. Le fragment AICD va migrer vers le noyau contribuer à la transcription et à la régulation des protéines neurales (41).



**Figure 4:** Formation des plaques amyloïdes (1) (41)

Chez les patients Alzheimer, la protéase- $\beta$  intervient dans le clivage de la protéine APP. Cela est peut-être dû à une augmentation de la synthèse de la protéine APP ou à une diminution, ce qui perturbe le bon fonctionnement de la protéase- $\alpha$  (25). Le fragment résultant du clivage, est un peptide A $\beta$  de longueur variable allant de 39 à 43 acides aminés, mais dont les principales formes comportent 40 et 42 acides aminés (25,40). Cette forme insoluble est très stable. Les peptides A $\beta$  40/42, présents en extracellulaire, s'accumulent et forment des agrégats nommés plaques amyloïdes qui vont perturber le bon fonctionnement neural (40) (Figure 5).

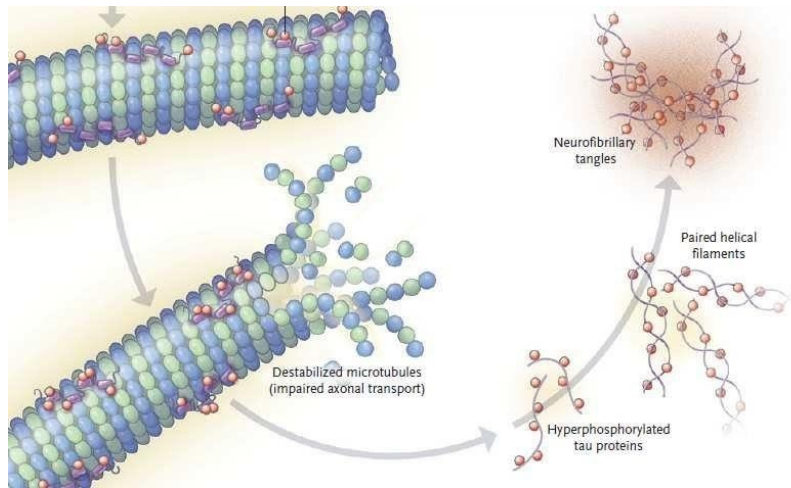


*Figure 5: Formation des plaques amyloïdes (2) (41)*

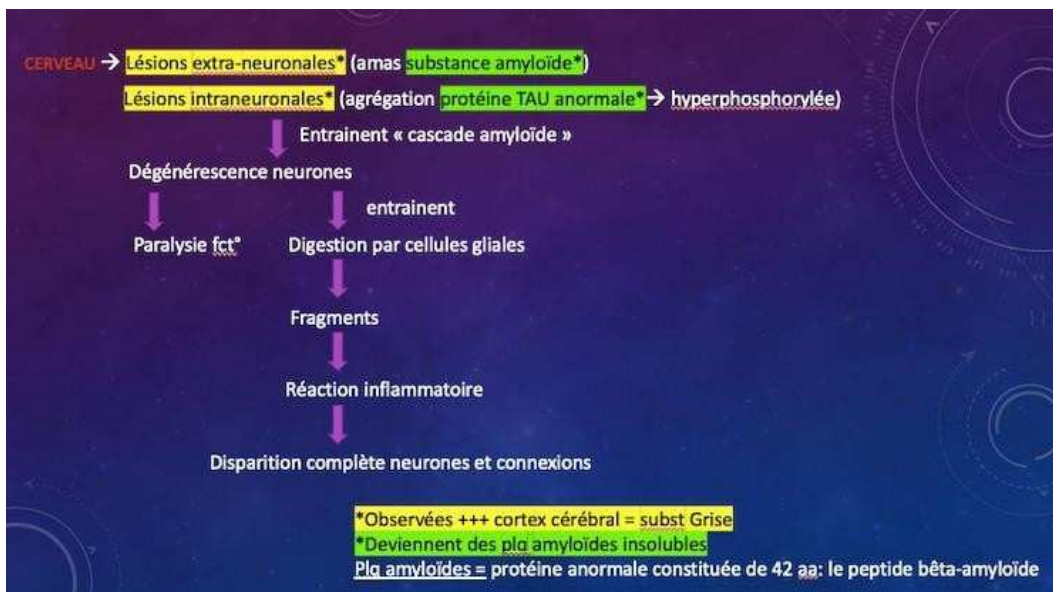
Par ailleurs, l'ApoE va contribuer à la création de plaques amyloïdes en se fixant fortement aux peptides Aβ. C'est donc un co-facteur important dans la formation des plaques. L'accumulation des plaques amyloïdes va être à l'origine d'une altération des membranes cellulaires par lyse de la protéine APP. De ce fait, le calcium va pénétrer massivement dans les neurones entraînant une réaction inflammatoire et la mort de la cellule. De plus, l'accumulation des plaques en extra-cellulaire bloque la transmission intersynaptique (27).

## 2. Hyperphosphorylation de la protéine Tau

La protéine Tau est un composant du cytosquelette de la cellule (25). En s'associant avec les microtubules, elle permet de maintenir leur organisation et leur polymérisation. Elle est majoritairement retrouvée dans l'axone des neurones. Le gène codant pour cette protéine est situé sur le chromosome 17. Les enchevêtrements neurofibrillaires retrouvés dans la MA correspondent à une accumulation de la protéine Tau hyperphosphorylée. En effet, l'augmentation intracellulaire en calcium causée par l'agglomération extra-cellulaire de peptides Aβ 40/42 provoque une hyperphosphorylation de la protéine Tau. Ceux-ci se détachent des microtubules et forment des filaments hélicoïdaux nommés neurofibrilles dans le cytoplasme des cellules. La perte de cette protéine va modifier la polymérisation du cytosquelette ce qui provoque une anomalie de fonctionnement intracellulaire et par la suite la mort du neurone (27) (Figure 6).



**Figure 6 :** Formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (27)



**Figure 7 :** Mécanismes neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer

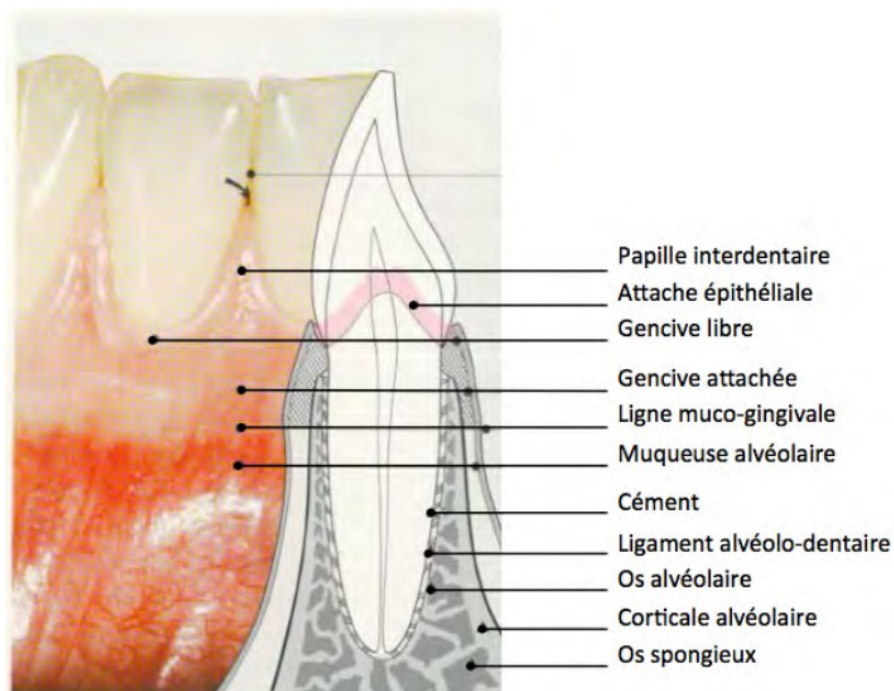
## PARTIE 2 : LA MALADIE PARODONTALE

### A. Généralités

#### 1. Définitions et anatomie

Le parodonte permet de maintenir l'intégrité fonctionnelle et structurelle des dents. C'est le « tissu de support de la dent » (42). Il permet également de constituer une barrière de protection empêchant la pénétration des micro-organismes dans les tissus sous-jacents (43).

Le parodonte superficiel comprend la gencive et le parodonte profond comprend l'os alvéolaire, le cément et le desmodonte (figure 8).



*Figure 8: Les structures parodontales (11)*

Les MP sont des maladies inflammatoires polymicrobiennes affectant les tissus de soutien de la dent. Lorsque l'inflammation débute au niveau de la gencive, la maladie prend le nom de gingivite. L'inflammation gingivale peut persister et progresser, et ainsi atteindre l'os alvéolaire, le cément et le ligament. La maladie prend alors le nom de parodontite. Ce stade plus avancé est caractérisé par la formation de poches parodontales, de résorptions alvéolaires et l'apparition de récessions gingivales (44,45).

#### 2. Prévalence

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 10% de la population mondiale est atteinte de formes sévères [46]. Elles sont la cause majeure de perte des dents (13,47), pouvant de fait nuire à la fonction de mastication, mais aussi à l'esthétique, et altérer la qualité de vie en représentant une forme d'invalidité.

Une étude réalisée aux Etats-Unis de 2009 à 2012 a comparé 2 classifications : celle du Center for Disease Control and Prevention and the American Academy of Periodontology (CDC-AAP) et celle de l' European Federation of Periodontology (EFP). Selon l'EFP, les maladies parodontales dans leurs stades débutant et modéré se caractérisent par une perte d'attache  $\geq 3$  mm sur au moins 2 sites proximaux non adjacents. Un stade sévère sera quant à lui caractérisé par une perte d'attachement proximale  $\geq 5$  mm sur au moins 30 % des dents (48). Le CDC-AAP définit la maladie parodontale débutante par la présence d'au moins 2 sites proximaux avec une perte d'attache  $\geq 3$  mm et  $\geq 4$  mm de profondeur de poche ou par la présence d'un site avec une profondeur de poche de  $\geq 5$  mm. Le stade modéré correspond à la présence d'au moins 2 sites proximaux avec une perte d'attache  $\geq 4$  mm ou au moins 2 sites proximaux avec une profondeur de poche  $\geq 5$  mm. Enfin, la parodontite sévère se définit par la présence d'au moins 2 sites proximaux avec une perte d'attache  $\geq 6$  mm et un ou plusieurs sites proximaux avec une profondeur de poche  $\geq 5$  mm. Il est à noter que cette classification ne prend pas en compte les gingivites, car les critères de définition appliqués ne sont pas assez reproductibles (7). En effet, le diagnostic de la gingivite est clinique, et le praticien doit rechercher une modification de la forme et/ou de l'aspect de la gencive caractérisée notamment par la présence d'une rougeur, d'un œdème, de saignements (49). Lorsque la classification de l'EFP est utilisée, 12,0 % de la population des Etats-Unis est atteinte de parodontite sévère et 65,8% de parodontite modérée ou superficielle. En revanche, lorsque la classification du CDC est appliquée, seuls 8,9% présentent un stade sévère de parodontite et 37.1% présentent un stade modéré ou superficiel [7] (Tableau 3).

Ainsi, même s'il est indéniable que la parodontite représente un problème de santé publique majeur en raison de sa prévalence élevée, le choix des critères d'évaluation des maladies parodontales peut faire varier considérablement les chiffres de cette prévalence (50).

**Tableau 3 : Prévalence des maladies parodontales en fonction de la classification choisie (7)**

	<b>EFP</b>	<b>CDC</b>
<b>Forme sévère</b>	12 % (SE = 0.7)	8.9 % (SE = 0.6)
<b>Formes modérée et superficielle</b>	65.8 % (SE = 1.0)	37.1 % (SE= 1.5)

### 3. Facteurs de risque

Les facteurs de risque d'une pathologie modifient l'incidence de celle-ci, sa sévérité et/ou sa gravité. Ils peuvent être locaux ou généraux, modifiables ou non, issus de l'environnement ou acquis génétiquement. Certains facteurs de risque locaux, tels les encombrements, les malpositions dentaires ou les restaurations iatrogènes peuvent avoir une influence sur les manœuvres d'hygiène, en favorisant l'accumulation du biofilm, ou bien, avoir un impact sur la réponse immunitaire et la cicatrisation de l'hôte (44,51). Des études épidémiologiques ont mis en évidence au cours des quinze dernières années



de nombreuses associations avec des facteurs de risques généraux tels l'âge et le sexe (52), l'ethnie (53), les habitudes de vie telles le tabagisme, la consommation d'alcool ou le stress (54), le diabète (52,55,56), les facteurs hormonaux tels l'ostéoporose, les carences en calcium et vitamines et les facteurs génétiques (51,57).

Même en l'absence de certitudes, ces différents paramètres doivent être pris en compte lors de la réalisation d'études cliniques car ils pourraient fausser l'estimation des résultats en créant des biais de confusion.

## B. Classifications des maladies parodontales

### 1. Historique

Du fait de l'hétérogénéité clinique des maladies parodontales, de nombreuses classifications ont été proposées afin de pouvoir poser un diagnostic précis et ainsi de mieux cibler les thérapeutiques parodontales. Les premiers travaux en ce sens remontent aux années 20. Même si le phénomène infectieux est alors un processus connu, un paradigme différent au sujet de la nature des maladies parodontales voit le jour en 1970: le rapport infection / réponse de l'hôte, à l'initiative d'Armitage.

Les systèmes de classifications n'ont cessé d'évoluer jusqu'à la classification de 1999, établie lors de la l'International Workshop on the Classification of Periodontal Diseases and Conditions (58), suite à une collaboration américano-européenne. Elle classe alors les différents types de maladies en 8 catégories, et de nouveaux termes sont créés, tels « parodontite chronique » « parodontite agressive » « abcès parodontal » ou « anomalies congénitales acquises » (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Classification (simplifiée) des maladies parodontales d'après Armitage, 1999 (58)

<b>1.MALADIES GINGIVALES</b>	-Maladies gingivales induites par la plaque dentaire -Maladies gingivales non induites par la plaque dentaire
<b>2.PARODONTITES CHRONIQUES</b>	-Localisées -Généralisées
<b>3.PARODONTITES AGRESSIVES</b>	-Localisées -Généralisées
<b>4.PARODONTITES MANIFESTATIONS DE MALADIES SYSTEMIQUES</b>	-Associées à une hémopathie -Associées à une anomalie génétique -Sans autre spécificité
<b>5.MALADIES PARODONTALES NECROTIQUES</b>	-Gingivite ulcéro-nécrotique (GUN) -Parodontite ulcéro-nécrotique (PUN)
<b>6.ABCES PARODONTAL</b>	-Abcès gingival -Abcès parodontal -Abcès péri-coronaire
<b>7.PARODONTITES ASSOCIEES A UNE PATHOLOGIE ENDODONTIQUE</b>	-Lésions combinées endo-parodontales
<b>8.ANOMALIES CONGENITALES OU ACQUISES EN RAPPORT AVEC LES MALADIES PARODONTALES</b>	-Facteurs dentaires modifiants ou prédisposants -Anomalies muco-gingivales au voisinage des dents -Anomalies muco-gingivales et édentation -Traumatisme occlusal

## 2. Classification de Chicago 2017

En 2018, une nouvelle classification des maladies parodontales a été proposée. Cette nouvelle classification a permis de proposer une aide au diagnostic et à la prise en charge de ces maladies (59). Elle évoque tout d'abord un point capital pourtant souvent peu décrit dans les anciennes classifications, la santé parodontale.

### 2.1. Santé parodontale (60)

La définition de la santé parodontale apparaît comme primordiale afin d'obtenir un point de référence commun pour évaluer la maladie. La santé parodontale se caractérise par l'absence d'inflammation ou un niveau faible d'inflammation d'un parodonte intact ou réduit. La santé parodontale peut prendre différents aspects. Les patients sans aucun antécédent de maladie parodontale auront un parodonte intact et sain alors que le parodonte des patients présentant des antécédents de maladie parodontale sera réduit et sain. Aussi, les conditions morphologiques altérées liées à une exposition antérieure à des processus pathologiques (par exemple une perte osseuse) doivent être redéfinies comme de nouvelles conditions saines en l'absence de symptômes cliniques et inflammatoires. La santé parodontale peut être cliniquement évaluée par l'absence d'inflammation et de symptômes cliniques, un saignement au sondage < 10 % et une profondeur de poches ≤ 3 mm. La santé parodontale doit prendre en compte les différents facteurs de risques de survenue de la maladie, ainsi que le rétablissement et le maintien de la santé. On parle de « déterminants de la santé parodontale », regroupant l'hôte et son l'environnement (facteurs de risques locaux et généraux) ainsi que des déterminants microbiologiques.

### 2.2. Gingivites induites par la plaque

La gingivite est une inflammation réversible de la gencive libre et attachée. L'inflammation se remarque par un changement de couleur, un œdème et un saignement spontané ou provoqué au sondage. Aucune perte de d'attache n'est présente et il n'y a pas de poches parodontales associées (Tableau 5).

**Tableau 5 : Récapitulatif des signes cliniques et radiographiques de la gingivite (49)**

	Sans parodontite				Avec parodontite traitée	
	Parodonte intact		Parodonte réduit		Santé	Inflammation gingivale
	Santé	Gingivite	Santé	Gingivite		
Perte d'attache	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Profondeur de poche*	≤ 3mm	≤ 3mm	≤ 3mm	≤ 3mm	≤ 4mm	≤ 3mm
Saignement au sondage	< 10%	≥ 10%	< 10%	≥ 10%	< 10%	≥ 10%
Alvéolyse radiographique	Non	Non	Possible	Possible	Oui	Oui

\*Force de sondage : 20 à 25 grammes ; pas de pseudo-poches

La classification définit les gingivites selon 3 origines (61) :

- Gingivite induite par le biofilm gingival uniquement ;
- Gingivite induite par un facteur de risque local ou systémique : hormones, tabac, leucémies, hyperglycémies ;
- Gingivite induite par une médication : certaines molécules antiépileptiques, immunosuppresseurs et contraceptifs oraux.

### 2.3. Gingivites non induites par la plaque

Dans cette classification, les maladies gingivales non induites par les biofilms oraux se décomposent en 8 catégories (62) :

- Désordres génétiques développementaux ;
- Infections spécifiques (bactérienne, virale, fongique) ;
- Pathologies inflammatoires et auto-immunes (réactions d'hypersensibilité, maladies auto-immunes, lésions inflammatoires granulomateuses...) ;
- Processus réactionnels ;
- Néoplasmes ;
- Maladies endocriniennes, nutritionnelles et métaboliques ;
- Lésions traumatiques (traumatismes physique/mécanique, brûlures chimiques, lésions thermiques) ;
- Pigmentations gingivales (mélanoplasie, mélanose tabagique)

### 2.4. Parodontites

La classification décrit trois types de parodontites :

- Parodontites nécrotiques
- Parodontites comme expression d'une maladie systémique
- Parodontites induite par la plaque uniquement

Ces dernières regroupent les parodontites agressives et les parodontites chroniques qui se distinguent par leur stade et leur grade (59) (Tableau 6). Il y a parodontite induite par la plaque si CAL sur au moins 2 dents non adjacentes et existence d'une alvéolyse interdentaire (une perte d'attache sans alvéolyse ne correspond pas à une parodontite).

**Tableau 6 : Critères des stades et des grades de la classification des parodontites (49)**

<b>STADES : SÉVÉRITÉ - COMPLEXITÉ</b>					
		Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 4
<b>Sévérité</b>	→ Perte d'attache interdentaire*	1 à 2 mm	3 à 4 mm / non	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	→ Alvéolyse radiographique	< 15%	15 à 33%	≥ 50%	≥ 50%
	→ Dents absentes pour raisons parodontales	0	0	≤ 4	≥ 5
<b>Complexité</b>	→ Profondeur de poche	≤ 4 mm	≤ 5 mm	≥ 6 mm	≥ 6 mm
	→ Alvéolyse radiographique	Horizontale essentiellement	Horizontale essentiellement	Verticale ≥ 3 mm	Verticale ≥ 3 mm
	→ Lésions inter-radicaire	Non ou classe I	Non ou classe I	Classes II ou III	Classes II ou III
	→ Défaut crestal	Non ou léger	Non ou léger	Modéré	Sévère
	→ Besoin en réhabilitation complexe**	Non	Non	Non	Oui
<b>Étendue</b>	→ Elle est considérée comme <b>localisée</b> lorsqu'elle touche < 30% des dents et <b>généralisée</b> si elle touche > 30% des dents				

<b>GRADES : RAPIDITÉ DE PROGRESSION</b>				
	Taux de progression	Grade A - Faible	Grade B - Modéré	Grade C - Rapide
<b>Critères</b>	→ Perte d'attache ou alvéolyse radiographique sur les 5 dernières années	Non	< 2 mm	≥ 2 mm
	→ Ratio pourcentage d'alvéolyse/âge*	< 0,25	0,25 à 1	> 1
	→ Ratio quantité de plaque/destruction parodontale***	Importante / faible	Normal	Faible / Importante
<b>Facteurs modifiants</b>	→ Consommation quotidienne de cigarettes	Non	< 10	≥ 10
	→ Diabètes	Non	Oui HbA1c < 7,0%	Oui HbA1c ≥ 7,0%

\*au site le plus atteint. \*\*à moduler en fonction de dysfonction masticatoire, de trauma occlusal secondaire (mobilité ≥ 2), d'effondrement occlusal, de moins de 20 dents résiduelles (10 paires antagonistes)... \*\*\*attention à certaines formes spécifiques avec atteinte des molaires/incisives

## C. Microbiote parodontal

### 1. Formation du biofilm

Un biofilm correspond à une organisation de micro-organismes au sein d'une matrice composée de protéines, d'acides nucléiques et de polysaccharides extracellulaires, pouvant coloniser tous les environnements. Les biofilms se forment en effet spontanément sur les surfaces ; ils sont donc omniprésents dans notre environnement (63). Le biofilm a une croissance organisée. Son développement comprend des étapes d'association, d'adhérence puis de multiplication et de maturation (Figure 9). Lors de l'étape d'association, les bactéries se fixent par des liaisons faibles, issues de forces physiques à la surface des dents. Ensuite, elles adhèrent de manière plus forte grâce à des récepteurs nommés adhésines. Sur des colonisateurs primaires vont adhérer des colonisateurs secondaires marquant l'étape de coagrégation.

De la multiplication de ces bactéries vont naître des micro-colonies. Pour permettre leur coopération, elles créent, lors de l'étape de maturation, un système circulatoire au sein du biofilm. Cela leur permet d'échanger leurs facteurs de virulence et leurs métabolites afin de mieux résister et de se multiplier (64). En effet, le biofilm va conférer de nombreux avantages aux bactéries et notamment les rendre moins sensibles aux antibiotiques ainsi qu'à la réponse immunitaire de l'hôte (44)

En 1898, Black utilisa le mot de plaque dentaire pour décrire une masse microbienne à la surface des dents, longtemps considérée comme une simple accumulation de cellules bactériennes, sans structure organisée. Pourtant, la plaque dentaire est bien un biofilm organisé correspondant à une communauté microbienne hétérogène, adhérente aux surfaces dentaires. Sa composition varie selon la localisation, de l'hygiène du patient, et des différents facteurs de risques associés.

En l'absence de manœuvres d'hygiène bucco-dentaire, qui permettent son élimination régulière, le biofilm fournit, à chaque étape de son développement, un nouvel environnement favorable à la croissance de bactéries responsables de pathologies bucco-dentaires.

## 2. Flore gingivale

Environ 700 espèces différentes de micro-organismes vivent en symbiose dans la cavité orale dont la moitié ne sont pas cultivables en laboratoire (16).

### 2.1 Flore supra-gingivale (65)

Avec l'arrêt des manœuvres d'hygiène bucco-dentaire, les premières bactéries à coloniser la surface dentaire sont des bactéries aérobies et anaérobies facultatives à Gram positif, cariogènes.

- Les colonisateurs précoces sont majoritairement des cocci puis des bâtonnets aérobies à Gram positif : *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* et *Streptococcus mitis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, ainsi que quelques cocci anaérobies à Gram négatif du genre *Veillonella*.
- Après 3 jours, les colonisateurs secondaires apparaissent. Ce sont essentiellement des bâtonnets, puis des bactéries fusiformes et filamenteuses, anaérobies à Gram négatif : *Fusobacterium sp*, *Haemophilus sp*, *Porphyromonas sp*, *Lactobacillus sp*, *Veillonella sp*, et *Treponema sp*.
- Après 1 semaine, les bactéries filamenteuses commencent à remplacer les cocci. Le biofilm supragingival s'enrichit progressivement avec de nouvelles bactéries (dont *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tanarella forsythia* et *Treponema denticola*).
- Après 3 semaines, les colonies bactériennes en colonnes sont remplacées par des agrégats denses de bactéries filamenteuses orientées perpendiculairement à la surface colonisée.

### 2.2 Flore infra-gingivale (66,67)

La flore infra-gingivale débute généralement à partir d'un dépôt de plaque supra-gingival. Elle s'associe, s'organise et évolue sous forme de complexes bactériens de type anaérobie, car cette zone est en effet dépourvue d'oxygène. L'étude de Socransky et al. (68) a permis de mettre en évidence 6 complexes bactériens et leur effets cliniques (figure 9)(68,69) :

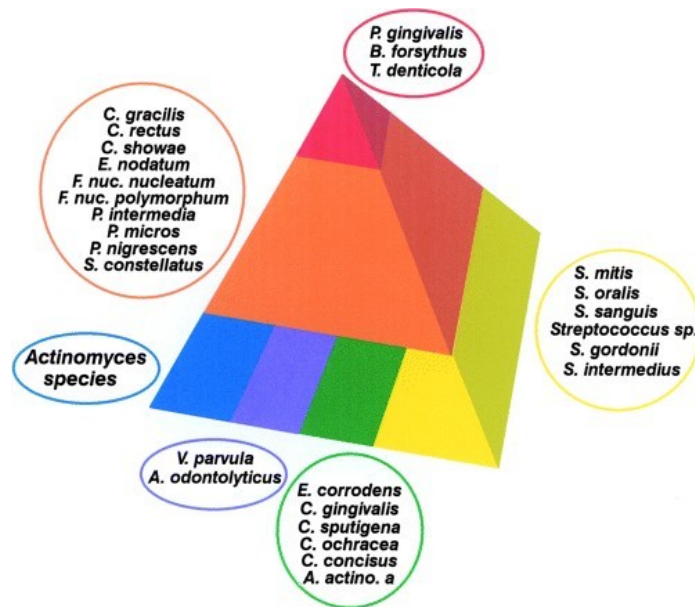


Figure 9: Les différents complexes bactériens (69)

Les espèces des complexes jaune, vert puis violet sont les premières à initialiser la formation de biofilms. Ces complexes colonisateurs primaires sont compatibles avec la santé parodontale. Ils adhèrent initialement à la surface radiculaire, puis se multiplient et modifient l'environnement pour permettre la colonisation secondaire des bactéries des complexes orange puis rouge, à potentiel parodontopathogène (Figure 10). Ces bactéries anaérobies Gram - sont faiblement retrouvées chez les personnes présentant un parodonte sain. Le complexe rouge, le plus délétère, est associé aux parodontites sévères, à une augmentation de la profondeur des poches parodontales ainsi qu'à un important saignement au sondage. Les plus grandes profondeurs de poche sont le plus souvent associées avec la présence de *Pg* seul ou en association (68).

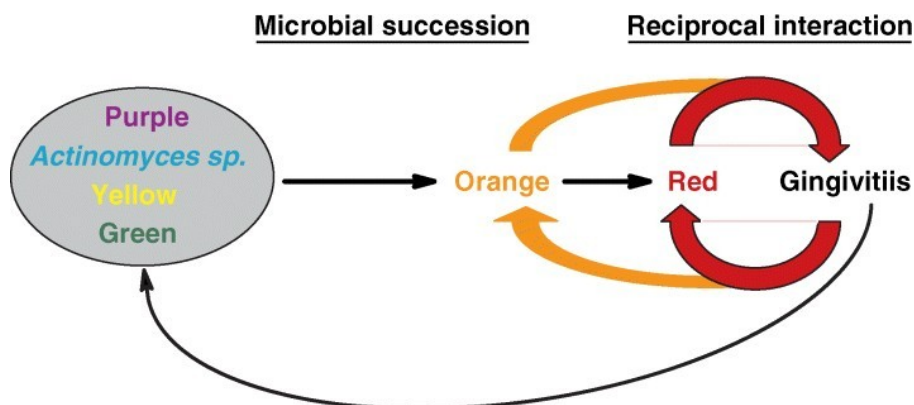
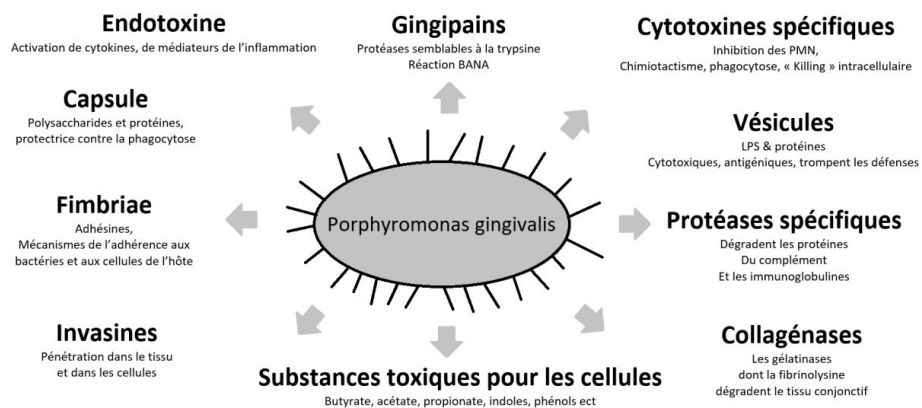


Figure 10: Evolution de la composition du biofilm sous gingival (69)

L'étude du microbiote a donc permis de mettre en évidence les différents rôles des bactéries constituant le biofilm. Certains micro-organismes ont la capacité d'orchestrer la dysbiose permettant l'invasion et la

propagation de l'infection (70). Ils agissent principalement dans l'intérêt d'autres espèces présentes afin d'engendrer une destruction massive (71). Ces micro-organismes sont nommés « clés de voûte ». Dans le cadre du biofilm parodontopathogène, *Pg* est la bactérie initiatrice de l'infection. C'est un bacille gram négatif, anaérobie, non motile et hautement virulent. A l'aide de motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes (Pathogen Associated Molecular Patterns ou PAMPs) comme les protéases gingipaines ou les lipopolysaccharides (LPS), il a la capacité de pénétrer et de détruire les tissus ainsi que de désactiver les défenses immunitaires de l'hôte (71, 72) (Figure 11).



**Figure 11:** Les PAMPs de *Porphyromonas gingivalis* (63)

Il apparaît donc que « pour que la santé parodontale soit atteinte ou maintenue, la composition du microbiote sous-gingival doit être réorientée vers une composition compatible avec la santé gingivale (73).

#### D. Prévention et traitements

Comme dans la plupart des maladies, les préventions primaires et secondaires jouent un rôle essentiel dans l'interception et la prise en charge précoce du patient. Une bonne hygiène buccale a toujours été considérée comme un pilier de la santé parodontale. De ce fait, une éducation thérapeutique ainsi que des contrôles cliniques et radiologiques doivent être réalisés lors de visites régulières. Leur fréquence dépendra de multiples facteurs et notamment de l'état de santé du patient, de son hygiène de vie et d'éventuelles prédispositions à développer des maladies parodontales [11]. Par ailleurs, les maladies parodontales sont le plus souvent chroniques et asymptomatiques. Elles évoluent à bas bruit, ce qui peut provoquer, si un suivi régulier n'est pas effectué, des retards de prise en charge (74).

Le traitement de la maladie parodontale débutante, au stade de gingivite, consistera en une motivation et une éducation à l'hygiène orale ainsi qu'un détartrage supra et infra gingival. Pour rappel, la plaque ne représente que 20 % du risque direct de développer une parodontite, alors que les 80 % restants reposant sur des facteurs de risque directs et indirects peuvent être responsables du développement de maladies parodontales (75). Les facteurs de risques modifiables tels que le tabac ou certains

médicaments devront donc être supprimés ou substitués. Une fois cela réalisé, la cicatrisation des tissus permettra un retour à l'état initial (49,76).

Lorsque la maladie atteint le parodonte profond, les méthodes d'hygiène et d'assainissement supra-radriculaire ne suffisent plus. Il faudra éliminer le biofilm situé en profondeur dans les poches parodontales et nettoyer les surfaces radiculaires. Des curettes ou des ultrasons sont utilisés pour détartrer, surfacer et débrider les racines (76). Des études révèlent qu'un traitement réalisé en une ou plusieurs séances, avec des curettes ou des ultra-sons apporte des résultats similaires, à moyen et long terme (77). Au traitement mécanique sera associé un traitement médicamenteux. Lors du débridement ultrasonore, en irrigation sous gingivale ainsi qu'en bain de bouche, les antiseptiques améliorent de manière non négligeable le traitement des poches parodontales. L'utilisation d'antibiotique sera réservée à certaines situations bien précises comme par exemple une parodontite de stade avancé ou pour des patients présentant un potentiel de cicatrisation limité (76).

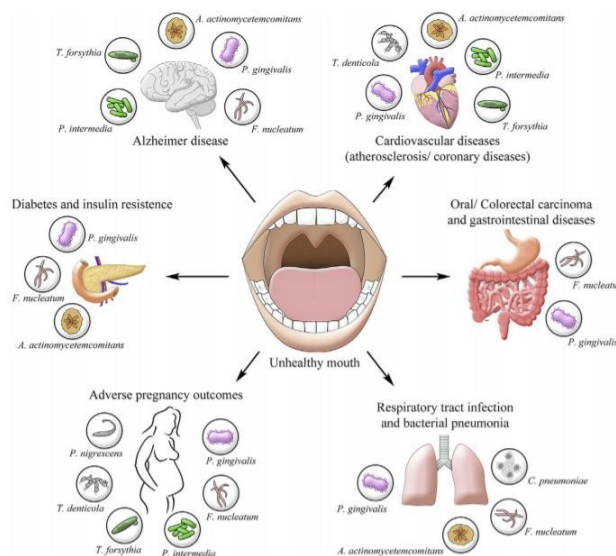
Lorsque la maladie est à un stade avancé, des chirurgies d'assainissement doivent être réalisées et associées ou non avec une correction ou une régénération des tissus lésés. Les facteurs de risques généraux et locaux doivent être modifiés. Cela implique parfois d'entreprendre une prise en charge pluridisciplinaire comprenant par exemple, des consultations de prothèses, d'orthodontie ou encore de diabétologie. Cependant, et à la différence de la gingivite, la parodontite ne guérit jamais complètement, au mieux elle se stabilise (44).

### **E. Santé parodontale et santé générale**

Des associations ont notamment été établies entre maladies parodontales d'une part et maladies cardiovasculaires, maladies respiratoires, diabète, ostéoporose et grossesse d'autre part (45,76,78) (figure 12).

Des bactériémies se produisent quotidiennement lors de la mastication, des brossages dentaires ou lors de soins (76,78). Les bactéries orales ainsi que leurs toxines et enzymes peuvent ainsi accéder aux différents organes en empruntant la voie sanguine. Chez des patients atteints de maladies parodontales, l'épithélium lésé et ulcéré constitue une porte d'entrée idéale. Les bactéries sont alors capables de migrer et de créer des foyers infectieux ectopiques (45, 76). Par ailleurs, les cytokines inflammatoires produites au niveau de la gencive atteignent aussi la voie sanguine (45,76). Leur présence engendre une inflammation systémique qui peut exacerber les phénomènes inflammatoires déjà présents (45,76,78).





**Figure 12:** Lien entre bactéries parodontales et santé générale (78)

Récemment, *Pg* et ses LPS ont été retrouvés dans le cerveau et le liquide cébrospinal de patients décédés de la MA (79,80). *Pg* aurait en effet la capacité de détourner le système immunitaire pour circuler jusqu'au cerveau et de traverser la barrière hémato encéphalique (78). Celle-ci est déficiente chez les patients âgés et particulièrement chez ceux atteints de la MA. L'inflammation cérébrale constante altère en effet le bon fonctionnement et l'intégrité de cette barrière (78). Les bactéries présentes dans le sang peuvent alors pénétrer dans l'encéphale ce qui influencerait la progression de la MA (72,78).

## F. Maladies parodontales et maladie d'Alzheimer

De récentes études ont en effet mis en lumière un lien potentiel entre MP et augmentation de l'incidence et/ou de la progression de la MA (81-84). En effet, l'hypothèse de connexions anatomiques entre cavité orale et SNC sont avancées, notamment illustrées par le passage d'agents microbiens oraux vers la sphère neuronale via la voie orale-nasale-olfactive ou par le biais de leucocytes circulants. Cependant, la composition des communautés orales microbiennes chez les patients atteints de la MA ainsi que le fait de savoir si ces bactéries orales sont associées ou non avec la sévérité de l'atteinte restent des données encore largement inconnues.

Dans ce contexte, Il est à souligner que l'amélioration de l'indice de plaque modifie favorablement la composition microbiologique orale (85-87) et pourrait permettre de réduire l'incidence des pathogènes sur la pathologie neuronale. De plus, la perte de dents conduirait à une diminution de la qualité de la nutrition, et ainsi une diminution de l'apport en vitamines et nutriments, importants pour la santé du SNC (88). Ces hypothèses vont dans le sens d'une prévention et d'un suivi bucco-dentaire plus systématique chez les personnes âgées, d'autant qu'ils représentent des moyens accessibles pour tenter de réduire l'incidence des troubles neurocognitifs majeurs chez ces populations.

### **PARTIE 3 : SANTE ORALE, MICROBIOLOGIE ORALE ET MALADIE D'ALZHEIMER**

La santé bucco-dentaire (SBD) est définie de manière très variée depuis plusieurs décennies. Le concept de SBD a, il est vrai, souvent été assimilé à une absence de maladie.

Selon certains auteurs, « La SBD désigne l'absence de douleur chronique buccale ou faciale, de cancer buccal ou pharyngé, de lésion buccale, d'anomalie congénitale telle que fissure labiale ou bec-de-lièvre, de parodontopathie (affection touchant les gencives), de carie et de déchaussement des dents, ainsi que d'autres pathologies et troubles affectant la bouche et la cavité buccale. » (89) D'autres définitions reprenant une vision similaire posent aussi que « La SBD signifie beaucoup plus qu'avoir des dents saines. Elle désigne l'absence de douleurs chroniques oro-faciales, de cancers buccaux et pharyngés (gorge), de lésions des tissus mous de la bouche, d'anomalies congénitales telles que bec de lièvre et fente palatine, et quantités d'autres maladies et troubles qui touchent les tissus bucco-dentaires et crânio-faciaux collectivement désignés sous le nom de complexe crânio-facial. » (90), ou que « La SBD suppose en particulier des gencives et des dents saines, mais elle signifie également que la vie des personnes ne soit pas affectée par un certain nombre d'autres conditions notamment les maladies de la muqueuse orale, les cancers de la bouche et de la gorge, les troubles de l'occlusion, les anomalies congénitales (...), les dysfonctions occluso-articulaires, (...)). » (91)

Il est cependant à souligner que l'« on peut définir la SBD comme l'absence de maladies bucco-dentaires et de situations qui compromettent ou limitent le bien-être fonctionnel, social, psychologique, et économique d'un individu. » (92) En effet, d'autres définitions ont souhaité intégrer ces notions de bien-être et de qualité de vie, en expliquant notamment qu'« une dentition exempte de soucis et fonctionnelle qui permet aux individus de brigrer la fonction sociale à laquelle ils aspirent. » (93) et que « la SBD est un état des tissus et des structures associés à l'appareil bucco-dentaire d'une personne qui contribue à son bien-être physique, mental et social et qui améliore sa qualité de vie, en lui permettant de s'exprimer, de s'alimenter et de socialiser sans douleur, malaise ou gêne. » (94) et qu'elle « désigne un état qui permet de sourire, parler, manger et aimer, avec une intégrité bucco-dentaire initiale ou retrouvée, en l'absence réelle ou supposée de pathologies de la sphère orofaciale, dans un contexte de bien-être physique, psychique et social. » (95)

Cette dernière définition tend à rejoindre celle de la santé générale de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui pose que la santé est « un état de complet bien-être physique, mental et social, [qui] ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité » (96). La santé est ainsi prise en compte dans sa globalité et associée à la notion de bien-être.

Il est en effet à souligner que concepts de SBD et de santé générale ne sont pas séparables. (97)

La Fédération Dentaire Internationale (FDI) a ainsi dévoilé en 2016 une nouvelle définition universellement applicable. La santé bucco-dentaire est « multiforme et inclut, entre autres, la capacité de parler, sourire, sentir, goûter, toucher, mâcher, déglutir et exprimer des émotions par les expressions

du visage avec confiance, sans douleur et sans gêne, ainsi que les pathologies du complexe craniofacial.

»

D'autres attributs liés à la définition déclarent que la SBD :

- Est une composante essentielle de la santé, du bien-être physique et mental, qui s'inscrit dans un continuum influencé par les valeurs et les comportements des personnes et des populations,
- Reflète les attributs physiologiques, sociaux et psychologiques essentiels à la qualité de la vie,
- Est influencée par les expériences, perceptions et attentes évolutives des individus, ainsi que par leur faculté d'adaptation.

Cette nouvelle définition a été élaborée par les membres du groupe de réflexion Vision 2020 de la FDI, composée de spécialistes de la santé bucco-dentaire, de la santé publique et de l'économie de la santé, et a pour objectif, selon le Prof. David Williams, co-président du groupe de réflexion, de « sensibiliser aux diverses dimensions de la santé bucco-dentaire et (de) mettre en avant le fait qu'il ne s'agit pas d'une notion isolée, mais qu'elle est intégrée au cadre plus large de la santé globale ».

La santé bucco-dentaire est de fait le reflet souvent fidèle de la santé générale et le lien avec plus d'une cinquantaine de maladies systémiques (7,8,9,10). Des associations ont notamment été établies entre maladies parodontales d'une part et maladies cardiovasculaires, maladies respiratoires, diabète, ostéoporose et grossesse d'autre part (5,76,78).

La classification de Chicago de 2017 évoque ainsi un point capital pourtant souvent peu décrit dans les anciennes classifications, la santé parodontale, notion primordiale afin d'obtenir un point de référence commun pour évaluer la maladie. Cette santé parodontale peut être cliniquement évaluée par l'absence d'inflammation et de symptômes cliniques, un saignement au sondage < 10 % et une profondeur de poches  $\leq 3$  mm (60). Elle doit prendre en compte les différents facteurs de risque de survenue de la maladie, ainsi que le rétablissement et le maintien de la santé. On parle de « déterminants de la santé parodontale », regroupant l'hôte, son l'environnement, ainsi que des déterminants microbiologiques (60).

Environ 700 espèces différentes de micro-organismes vivent en effet en symbiose dans la cavité orale (16). Les modifications défavorables de la dent et de son environnement peuvent entraîner des complications parodontales. La parodontite est une maladie inflammatoire chronique, très fréquente, dont l'étiologie principale est de nature infectieuse. Principalement, des modifications microbiologiques du biofilm gingival (dysbiose) sont responsables de la pathologie; en particulier, l'émergence de bactéries anaérobies, telles que *Pg* ou la multiplication d'HHV.

Récemment, *Pg* et ses LPS ont d'ailleurs été retrouvés dans le cerveau et le liquide cébrospinal de patients décédés et atteints de MA (79,80). À ce jour, les bactéries orales les plus souvent retrouvées dans le SNC et associées aux troubles cognitifs sont des Spirochetes telles que des Treponèmes ou *Borrelia burgdorferi* (98), *Pg* (83,98), *Fusobacterium nucleatum* et *Prevotella intermedia* (83). Non seulement chez l'homme, *Pg*, l'agent pathogène clé de la parodontite chronique, est significativement

identifié dans le cerveau des patients décédés de MA mais la plausibilité biologique est renforcée par les études en laboratoire qui révèlent que l'infection chez la souris entraîne une colonisation du cerveau et une augmentation de la production de plaque amyloïde (79). Une récente revue de la littérature (13) met en évidence les résultats de précédentes études mettant ainsi en évidence la présence de hauts niveaux de IgG anti-*Pg* impliquant une plus grande possibilité de déficit cognitif et de mémoire (99,100). La cavité buccale héberge de plus de nombreux HHV (Epstein-Barr Virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV), Herpès Simplex Virus de type 1 (HSV-1), HHV-6, -7 et -8), HHV-6 et HSV-1 étant 2 virus neurotropes fréquemment retrouvés au niveau cérébral. Des études récentes apportent des données nouvelles en faveur d'une implication des herpes virus neurotropes : on observe une augmentation de l'abondance de HSV-1 et HHV-6A/7 dans le cerveau de patients décédés et atteints de MA (101), et notamment l'interaction entre le CMV et le HSV-1 serait significativement associée au risque de développement de la MA (102). De plus, un traitement antiviral agressif contre les HV est associé à une diminution ultérieure de l'incidence de MA (103).

Enfin, une étude de type cas/témoins publiée en novembre 2019 dans le Journal of Alzheimer's disease a analysé pour la première fois le microbiome salivaire de patients atteints de la MA (104). La flore salivaire des patients atteints présentait moins de diversité que le groupe témoin, toutefois sans altération de la flore dominante. De plus, il a été retrouvé une grande quantité de *Moraxella*, *Leptotrichia*, *Sphaerochaeta* abondants chez les patients atteints de la MA avec une abondance relative de *Moxarella* significativement plus importante chez les patients atteints ( $p < 0.05$ ). *Rothia* était abondant chez les témoins. Ces données pourraient constituer des clés bactériennes contribuant à la différence de composition du microbiote oral entre patients atteints et témoins. Aucune bactérie n'a toutefois été retrouvée associée à la sévérité de la maladie. Il faut cependant nuancer ces propos puisque cette étude n'a pas inclus de prélèvement de plaque, ou de sulcus, or, « beaucoup de bactéries parodontopathogènes existent dans les niches parodontales ou la plaque dentaire : ces types échantillons seront à inclure dans de futures analyses », ils serviraient ainsi de « support pour des études (...) concernant le rôle du microbiome oral dans le développement de la MA ».

Si la diffusion d'agents pathogènes oraux constitue la piste privilégiée permettant d'établir un lien entre dysbiose orale et inflammation neuronale, les effets inflammatoires de cette migration microbienne pourraient être également aggravés par la diffusion de médiateurs de l'inflammation de la cavité orale vers les organes périphérique via la circulation systémique. En effet, des travaux documentent le fait que des cytokines pro-inflammatoires, telles IL-1 et 6, et des TNF, peuvent atteindre la circulation systémique notamment au cours du brossage des dents. Les patients atteints de parodontopathies présenteraient ainsi des niveaux plus élevés de protéine C réactive que les témoins (105,106,107).

L'hypothèse d'une connexion infectieuse de la sphère oro-pharyngée au cerveau souligne l'intérêt d'analyser le lien entre maladie parodontale et MA. Une revue de la littérature a ainsi été réalisée afin de faire un point sur l'état actuel de la littérature scientifique concernant le lien entre ces deux maladies

(article 1). L'objectif de cette revue était d'examiner le lien entre MA et maladie parodontale in vivo chez des patients âgés de 65 ans et plus. Les bases de données (PubMed (MEDLINE), the Cochrane Library, et Embase) ont été analysées pour trouver les références pertinentes jusqu'au 21 juin 2021. Les auteurs ont indépendamment sélectionné les études et extrait les données. La qualité des études incluses a été vérifiée à l'aide des outils d'évaluation de la qualité des National Institutes of Health. Cinq études ont été incluses. Les études sélectionnées ont décrit dans leurs résultats une augmentation de *Fn* chez les patients atteints de MA (p ajusté = 0,02), et son incidence était liée à *Campylobacter rectus* (*Cr*) et *Pg* (HR ajusté = 1,22 (1,04-1,43), p = 0,012) ainsi qu'à *An* (HR brut = 2,0 (1,1-3,8)). La présence d'une parodontite au départ était associée à une multiplication par six du taux de déclin cognitif sur une période de suivi de 6 mois (changement moyen dans l'échelle d'évaluation cognitive de la MA ou Alzheimer's Disease Assessment Scale (cognition) (ADAS-Cog) de  $2,9 \pm 6,6$ ). La présente revue a ainsi mis en évidence une association entre maladie parodontale et MA et renforce l'hypothèse que le traitement de la maladie parodontale pourrait être un moyen de prévenir la MA.

**Article 1. Revue Systématique de la littérature**

***Analysis the link between periodontal diseases and  
Alzheimer's disease : a systematic review***



Systematic Review

# Analysis the Link between Periodontal Diseases and Alzheimer's Disease: A Systematic Review

Leslie Borsa <sup>1,2,3,\*</sup> , Margaux Dubois <sup>1,2</sup>, Guillaume Sacco <sup>4,5,6</sup> and Laurence Lupi <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Université Côte d'Azur, 06300 Nice, France; borsa.l@chu-nice.fr (M.D.); Laurence.LUPI@univ-cotedazur.fr (L.L.)  
<sup>2</sup> Pôle Odontologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Université Côte d'Azur, 06000 Nice, France  
<sup>3</sup> UPR7354–Laboratoire Microbiologie Orale, Immunothérapie et Santé (Micoralis), Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Université Côte d'Azur, 06300 Nice, France  
<sup>4</sup> Clinique Gériatrique du Cerveau et du Mouvement, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Université Côte d'Azur, 06003 Nice, France; sacco.g@chu-nice.fr  
<sup>5</sup> Université Côte d'Azur, CoBTeK, 06100 Nice, France  
<sup>6</sup> Univ Angers, Université de Nantes, LPPL, SFR CONFLUENCES, 49000 Angers, France  
\* Correspondence: leslie.borsa@univ-cotedazur.fr



**Citation:** Borsa, L.; Dubois, M.; Sacco, G.; Lupi, L. Analysis the Link between Periodontal Diseases and Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9312. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179312>

Academic Editor: Florence Carrouel

Received: 22 July 2021

Accepted: 27 August 2021

Published: 3 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The hypothesis of an infectious connection from the oro-pharyngeal sphere to the brain underlines the interest in analyzing the link between periodontal disease and Alzheimer's disease. The aim of this systematic review was to examine the link between Alzheimer's disease and periodontal disease in patients aged 65 and over. Databases (PubMed (MEDLINE), the Cochrane Library, and Embase) were analyzed for relevant references up to 21 June 2021. The authors independently selected the studies and extracted the data. The quality of included studies was checked using the National Institutes of Health's quality assessment tools. Five studies were included. The selected studies described in their results an increase in *F. nucleatum* in Alzheimer's disease patients (adjusted  $p = 0.02$ ), and its incidence was linked to *C. rectus* and *P. gingivalis* (adjusted HR = 1.22 (1.04–1.43),  $p = 0.012$ ) as well as *A. naeslundii* (crude HR = 2.0 (1.1–3.8)). The presence of periodontitis at baseline was associated with a six-fold increase in the rate of cognitive decline over a 6-month follow-up period (ADAS-Cog mean change =  $2.9 \pm 6.6$ ). The current review suggests an association between periodontal disease and Alzheimer's disease. The treatment of periodontal disease could be a way to explore Alzheimer's disease prevention.

**Keywords:** Alzheimer's disease; periodontal disease; periodontitis; oral microbiota; *Porphyromonas gingivalis*

## 1. Introduction

Around 770 microorganisms compose the human oral microbiota. This microbiota forms a biofilm or dental plaque on the surface of teeth. Its composition is dynamic and depends on the host environment. In a healthy state, with good dental hygiene, the composition of the microbiota remains stable [1]. This ecosystem is in a fragile balance to maintain oral health. In healthy conditions, Gram-positive bacteria dominate the composition of the dental plaque. However, because of different factors such as sugars, acids, or a lack of tooth brushing, the plaque composition could evolve into having a greater proportion of Gram-negative anaerobic bacteria [2]. This altered balance, also named oral dysbiosis, can lead to oral pathologies such as periodontal disease (PD). The inflammation, which starts in the gum area, is called gingivitis. When the gum inflammation persists and progresses, it creates the conditions for the development of periodontitis [3,4], which can spread to the alveolar bone, the cementum, and the periodontal ligament. It is then characterized by the formation of periodontal pockets, alveolar resorptions, and periodontal recessions. Periodontitis is a frequent, chronic, and inflammatory disease.

Its etiology is mainly infectious, which affects the supporting tissues of the tooth. The pathogenicity of each species taken alone is relatively low, and cooperation between the bacteria is necessary. The periodontopathogenic bacteria *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Prevotella intermedia* (*Pi*), *Treponema denticola* (*Td*), *Tannerella forsythensis* (*Tf*), *Campylobacter rectus* (*Cr*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), and *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) release inflammation mediators and toxins, which go into the bloodstream and participate in systemic inflammation. Consequently, chronic periodontitis can contribute to the development of various pathologies [5].

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of neurocognitive disorders in the adult population, with nearly 47 million people affected worldwide. The estimated annual cost worldwide has exceeded 1000 billion US dollars [6], and except for severe neurodevelopmental disorders, disability related to neurocognitive disorders was the most significant compared to all other pathologies [7]. Despite progress made in the last 30 years in the understanding of neuropathological mechanisms, particularly concerning tau and beta-amyloid processes [8], the question of the etiopathogeny and risk factors of AD is still debated [9,10]. Among the risk factors studied, chronic inflammation and infectious pathologies constitute an interesting path of research [11]. In recent years, the hypothesis that PD is a risk factor for AD has been growing [12,13]. The oral cavity seems to represent a privileged observation space to study these issues because of the established link between oral health and more than fifty systemic diseases, including cardiovascular and pulmonary diseases, diabetes, and some forms of cancer [14–16]. The link between PD and AD could be explained by the spread of infectious or inflammatory agents migrating from the oral cavity to the brain [17–20]. According to Miklossy, J. and McGeer [21], a seven-fold-higher density of oral bacteria is found in the brain tissue of deceased AD patients compared to controls. The oral bacteria most found in the central nervous system and associated with cognitive impairment are spirochetes (*Treponema*) [22], *Pg* [23], *Fn*, *Pi*, *H. pylori*, and *B. burgdorferi*. In particular, *Pg*, the key pathogen of chronic periodontitis, is significantly identified in the brains of patients who have died from AD. Moreover, in mice models, an infection with *Pg* results in a colonization of the brain by this bacterium, and in an increased production of amyloid plaques within it [24].

The composition of the oral microbiota in AD patients and its association with the severity of the disease remain largely unknown. In the absence of an effective disease-modifying treatment for AD, a great deal of research is being carried out to prevent its onset and/or progression. It is therefore necessary to describe and understand the link between PD and AD. The questions are therefore these: "Is there a link between PD and AD?", and if so, "What would be the nature of this link?"

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Identification of Research Question

We carried out a systematic review of the scientific literature and reported the results according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines [25] (supplementary material, Table S1). The study was registered in PROSPERO, registration number is CRD42021270806.

Research questions were defined to answer the research objectives: "Is there a link between PD and AD?" and "What would be the nature of this link?" The PICO question was "Are people aged 65 and over (P) who have PD (I) compared with those without PD (C) at increased risk for AD (O)?"

### 2.2. Goals

The primary goal was to determine if a link between PD and AD can be said to clinically exist based on periodontal clinical markers in people over 65 years of age.

The secondary goal was to determine the microbiological pattern (the presence of specific periodontal bacterial pathogens) in people over 65 years of age with AD.



### 2.3. Eligibility Criteria

The conditions for eligibility were specified before the onset of screening.

The inclusion criteria were as follows: (i) human studies in which participants over 65 years of age were at least a part of the study sample; (ii) the analysis of the link between PD and AD was one of the objectives of the study; (iii) the evaluation of the PD and/or the bacterial microbiota related to PD was clearly defined; (iv) the diagnosis criteria for AD diagnosis were clearly defined; (v) clinical studies, longitudinal studies (cohort or case-control; retrospective and/or prospective), and transversal studies that evoked the link between periodontal disease and Alzheimer's disease; (vi) studies published between 2010 and 21 June 2021; and (vii) studies written in English.

Studies interested in other syndromes (e.g., Down syndrome or neurocognitive disorders not related to AD) and experimental studies on animals or on human tissues were excluded.

### 2.4. Information Sources and Search Strategy

The bibliographical research was performed through the following electronic databases: PubMed (MEDLINE)/the Cochrane database (Cochrane Library)/Embase.

The keywords used were "Alzheimer", "Alzheimer disease", "periodontal disease", "periodontitis", "calculi", "calculus", and "dental plaque". Keywords were mixed using Boolean operators, and MeSH terms (for MEDLINE and Cochrane) or Emtree (for Embase) were used depending on the database. For example, the search strategy used for PubMed (MEDLINE) database was ("Alzheimer's disease" (MeSH) or "Alzheimer") and ("Periodontal disease" (MeSH) or "Periodontitis" (MeSH) or "dental plaque" (MeSH) or "calculi" (MeSH) or "calculus").

### 2.5. Selection Process

Two authors manually extracted data independently. First, duplicates were removed. Then, articles of interest were selected based on their titles and abstracts. The final selection of the articles to be included was based on reading the full texts, according to the PICO characteristics, as well as inclusion and exclusion criteria. Reasons for exclusion were documented at each stage. Any discrepancy regarding references, selection criteria of the subjects, sample characteristics (number and age of participants as well as sample size calculation), diagnosis criteria of AD, diagnosis criteria of PD, outcomes and relevant data, follow-up duration, and results were solved by discussion between the authors.

### 2.6. Data Collection Process

For each eligible study, the following data were extracted by two members of the research team: first author, year of publication, study type, protocol, total number of patients, and covariates studied. The average age and the number of females were also extracted.

### 2.7. Risk of Bias

The National Institutes of Health's (NIH) study quality assessment tools for observational cohort and cross-sectional studies in addition to those of case-control studies were used to assess the quality of each eligible study [26]. In the case of any discrepancy, a consensus was reached after discussion and re-evaluation between two members of the research team, and, if necessary, the opinion of a third member of the review team was requested.

### 3. Results

A total of 802 articles were identified. After elimination of duplicates, 533 articles were retained. We finally obtained 70 articles to read fully. Among them, five articles were finally included in the qualitative analysis (Figure 1).

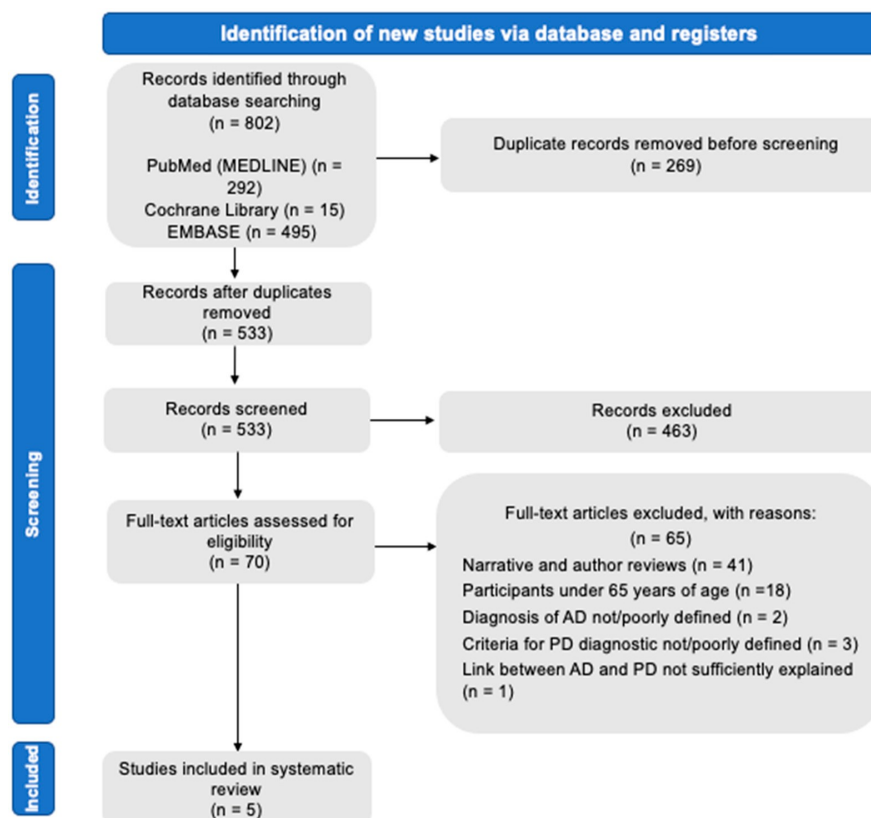


Figure 1. PRISMA flowchart diagram.

All the selected articles analyzed the link between PD and AD: three case-control studies [27–29], one observational cross-sectional study [30], and one cohort study [31] were analyzed.

#### 3.1. Characteristics of the Included Studies

The characteristics of the included studies are presented in the supplementary material, Table S2.

Only five studies met the inclusion criteria, and they provided data from populations in four countries: Italy [27], USA [28,30], UK [31], and Finland [29]. The number of participants ranged from 59 to 3251. The follow-up period for the only cohort study was 6 months [31].

Three studies [27,30,31] considered both clinical and bacterial criteria to define PD, one study [28] only considered bacterial criteria, and one study [29] only considered clinical criteria.

The tests used for AD diagnosis were the Mini-Mental State Examination (MMSE) test [27,28,31], the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition (DSM-IV) [28,29], the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision (DSM-IV-TR) [27], the Alzheimer’s Disease Assessment Scale–Cognitive Subscale (ADAS-Cog) [31], and the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria [28,31].

The results of the association between AD and periodontal indicators are presented in the supplementary material, Table S3.

3.2. Bias and Quality of Included Studies

Regarding bias, the quality of included studies was evaluated by the criteria of the NIH’s study quality assessment tools for observational cohort and cross-sectional studies in addition to those of case–control studies. Based on these criteria, two out of the five studies were qualified as good quality [28,29], while the remaining three studies [27,30,31] were rated as fair quality. The quality assessment tools for each selected study are presented in Figures 2 and 3.

NIH Quality assessment Case/Control studies	NIH Quality assessment criteria												
	Research question	Study population	Sample size justification	Cases and controls from same/similar population	Process to identify participants	Definition of cases and controls	Cases and controls randomly selected from those eligible	Use of current controls	Risk occurred prior to the condition that defined a case	Definition and validation of the measures of risk	Blinded assessors	Key potential confounding variables statistically measured	
Panzarella (2020)	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	N	Y	NR	N	
Noble (2014)	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	Y	Y	NR	Y	
Syrjala (2012)	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NR	Y	Y	N	

Figure 2. NIH quality assessment of case–control studies: Y, yes; N, no; NA, not applicable; and NR, not reported.

NIH Quality assessment Observational cohort and Cross-sectional studies	Research question	Study population	Participant rate at least 50% from eligible	Participants from same/similar population	Sample size justification	Exposure(s) measured prior to the outcome(s)	Sufficient time frame	Examination of different levels of exposure as related to the outcome	Definition and validation of the exposure measures	Exposure(s) assessed more than once	Definition of outcome measures	Blinded assessors	Loss to follow-up after baseline of 20% or less	Statistical measure and adjustment of key confounding variables
Beydoun (2020)	Y	Y	Y	Y	N	N	NA	Y	Y	N	Y	NR	NA	Y
Ide (2016)	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NR	Y	N

**Figure 3.** NIH quality assessment for observational cohort and cross-sectional studies: Y, yes; N, no; NA, not applicable; and NR, not reported.

### 3.3. Association between AD and Periodontal Bacterial Pathogens

Four studies examined the association between periodontal bacterial pathogens and AD [27,28,30,31].

One study found a significantly higher *Fn* load in AD than in controls and a higher bacterial load of *Td* in persons with amnesic mild cognitive impairment than in AD [27]. Another study provided evidence of an association between periodontal pathogens and AD, which was even stronger for older adults [30]. One study did not find a significant relationship between the serum levels of anti-*Pg* antibodies and the rates of cognitive decline, but showed evidence of a relative increase in pro-inflammatory status and a decrease in anti-inflammatory status over a 6-month follow-up period in participants with AD and PD [31]. Another study showed that participants with elevated *A. naeslundii* (*An*) serum immunoglobulin G (IgG) had a consistently higher risk for incident AD, whereas high antibody levels to *E. nodatum* (*En*) were significantly associated with a decreased risk of incident AD [28].

### 3.4. Association between Alzheimer's Disease and Clinical Periodontal Markers

Four studies examined the association between clinical periodontal markers and AD. One study estimated the diagnosis of AD as predictive of tooth loss, especially in subjects aged 80 years or older [27]. Another study showed that the presence of PD in AD was associated with a marked increase in cognitive decline over a 6-month follow-up period, independent of the basic cognitive state [31]. One study showed that persons with AD and persons with other types of major neurocognitive disorder (NCD) had an increased likelihood of having teeth with deep periodontal pockets compared to non-demented persons [29]. Two studies evoked the fact that the treatment of PD could be a way to explore AD prevention or treatment [30,31].

## 4. Discussion

### 4.1. Link between Alzheimer's Disease and Periodontal Disease

This systematic review including five studies provides evidence of a relationship between AD and PD. However, these pieces of evidence on the relationship between PD and AD need to be further investigated.

In the studies analyzed, the diagnosis of PD was based on clinical criteria [29], microbiological criteria [28], or both types of criteria [27,30,31]. The choice to determine the PD status through the clinical diagnosis of PD may be relevant if it is based on a complete periodontal charting by registering several parameters (probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), and plaque index (PI)) [32]. While the PPD was evaluated in all studies including a clinical diagnosis of PD [27,29–31], the clinical attachment level (CAL) was measured in only one study [30], the BOP was listed in one study [27], and the PI was registered in two studies [29,31]. The choice to apprehend PD status through bacteriological considerations may also be relevant, since it is known that certain bacteria and/or bacterial complexes are unfavorably associated with a state of PD [12,33,34]. Four studies analyzed the microbial status of participants [27,28,30,31]. The evaluation of the PD status through clinical and microbiological data was only done in three studies [27,30,31]. One study [28] used serological tests to select moderate to severe stages of PD. Ide et al. [31] refer to periodontitis by explaining that it was considered according to its moderate and severe forms, but without detailing them in the different tables or in the article itself. Indeed, only the presence or absence of periodontitis seems to be considered in the end. However, this publication also concludes that there was no clear relationship between the degree of PD and the severity of AD.

The initial examination leading to a probable diagnosis of AD, according to the DSM V, generally includes different aspects such as a cognitive assessment (including a global evaluation, usually with the MMSE), a functional assessment (IADL or ADL scales), a behavioral assessment, a clinical examination, and para-clinical examinations (biological examinations and magnetic resonance imaging (MRI)) [35], since only a lumbar puncture can establish a diagnosis of high probability, which is not required as a routine examination for this type of diagnosis.

If the MMSE test [36,37] is used on a recurrent basis [27,28,31], there are differences between the studies, as not all of them use the same reference systems to establish a diagnosis of AD. Two studies [28,29] used the DSM-IV criteria [38], and one other [27] used the DSM-IV-TR [39]; a criterion of the American Psychiatric Association and included in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders in 1994 [38] and 2000 [39], one study [31] used the ADAS-Cog [40], while others [28,31] used the criteria of the NINCDS-ADRDA [41]. Some studies have used a combination of several tests [27,28,31]. One study, using database results [30], selected patients based on their membership of the category of people with AD according to the codes of the International Classification of Diseases (ICD), version nine, for the diagnosis of AD, and the ICD, version 10, code G30, for the underlying cause of death [42,43]. Three studies used DSM-IV [27–29] in combination [27,28], or not [29], with other diagnostic tests. Only one study [27] refers to the use of MRI in the diagnosis of AD.

One study [29] considered the stage of major NCD, but did not associate it with a specific type of major NCD, and moreover did not really use it to assess the presence of PD, but to assess oral hygiene.

We wished to study non-genetic forms, and because genetic aetiologies are considered rare after this age [44], we chose to include in our review only studies targeting people over 65, or to study only this age group when the study included several, for more homogeneity. We also wished to focus our research on the clinical aspect of the link/association between the two diseases and therefore chose to exclude studies of a genetic type or that were carried out *in vitro*.

All the studies analyzed chose to include covariates such as age [27–31], sex [27–31], tobacco consumption [27–31], alcohol [27,30] or drug consumption [30], education [28–30], housing [29,30], income [30], marital status [29,30], ethnicity [28,30], sports activity [30], nutrition [30], and medical factors, such as obesity [27,30], hypertension [27,28], diabetes [27,28], cholesterol [27,28], a history of stroke [28], APoE4 carrier status [27,28], heart disease [27,28], allostatic load [30], and basic cognitive status [31], which can be potential confounding factors as some of these are common risk factors for PD and major NCD.

In AD, poor dental health, particularly the presence of PD, is associated with a marked increase in cognitive decline over a 6-month follow-up period [31]. However, this does not appear to be a relationship between low tooth counts, a possible indicator of past PD, and cognitive decline, suggesting that chronic active periodontitis is more important in driving cognitive decline once AD is established, and suggesting a direct relationship between PD and cognitive decline. However, no clear relationship has been shown between degree of PD and severity of major NCD [31]. Indeed, patients with AD are more likely to have poor oral hygiene and poorer oral health related to PD compared to people without AD [27,29]. Treatment of periodontitis may therefore be part of the care strategy in AD [31].

Whereas Ide et al. [31] showed that in AD patients the presence of PD is associated with a marked increase in cognitive decline, and reported evidence of a relative increase in pro-inflammatory status and a decrease in anti-inflammatory status over a 6-month follow-up period in participants with PD, they did not show a significant relationship between *Pg* antibody serum levels and the rate of cognitive decline, while others have shown a link between AD and certain periodontal pathogens [27,28,30]. Thus, the bacterial load of *Fn* appears significantly higher in AD [27]. The incidence of AD is increased in participants with high levels of IgG antibodies to *An*, and this appears to be even stronger when high levels of *En* are included in the model [28]. According to Beydoun et al. [30], *Pg*, *Pi*, *P. nigrescens* (*Pn*), *Fn*, *Cr*, *S. intermedius* (*Si*), *C. ochracea* (*Co*), and *P. melaninogenica* (*Pm*) could be related to increased AD mortality risk above 65 years of age, while the reverse could be true for *Aa*. *S. oralis* (*So*) was directly related to AD mortality risk among men. *Pg* and *Cr* were linked to an increased risk for incidence of AD over 65 years of age. *So* increased the risk of major NCD (all causes) in men, while *E. corrodens* (*Ec*) increased the risk of major NCD (all causes) in women. The reverse was true for *Si*, which appeared to be marginally and inversely associated with the risk of AD incidence in women [30]. This provides evidence of an association between periodontal pathogens and AD, which is even stronger for older adults. There is epidemiological evidence suggesting that eradication of *Pg*, among others, could be an effective way to delay the onset of AD, pending randomized clinical trials [30].

Further multimodal exploration of the role of periodontal infections, other oral health markers, and systemic host response may elucidate a potential new causal pathway for cognitive impairment in the elderly [28].

#### 4.2. Limitation of Selected Studies

The NIH's study quality assessment tools were used to assess the quality of each eligible study (Figures 2 and 3).

One of the major limitations of all the studies found for this systematic review was the diagnosis criteria used to define AD patients. Indeed, criteria used in these studies allowed for the diagnosis of neurocognitive disorders associated with Alzheimer's syndrome but, without a CSF sample, the proteinopathy related to AD could not be established. Thus, linking PD and AD on this basis could be controversial. The only conclusion possible is the association between PD and NCD. To confirm the hypotheses of an association between PD and AD, and to explore the possible physiopathological process underlying these two pathologies, future studies should include only well-phenotyping AD patients with a confirmed amyloidopathy, according to the last National Institute on Aging and Alzheimer's Association Research Framework [45].

It is also worth noting the multiplicity of criteria used to define PD in the selected publications. Moreover, three studies (Beydoun et al. [30], Panzarella et al. [27], and Noble et al. [28]) used existing databases. Thus, the investigators did not collect the data themselves, and this could have led to selection biases such as misclassification of participants [27], underdiagnosis of AD, or underestimation of the severity of periodontal disease [30], due to the lack of specific data [28]. Both aspects make a strict comparison between the different results difficult. The use of more stringent and standardized methods

seems to be necessary to obtain a more reliable diagnosis. For PD, a systematic integration of a clinical and a microbiological component may be needed.

Calibration of dental examiners prior to the data collection period has been described as weak by Syrjälä et al. [29], with furthermore a lack of assessment of the reliability of oral examinations between and within examiners [29]. The database studies [27,28,30] did not mention this problem; nevertheless, it may exist, leading to bias in the selection of those with and without PD. The other study [31] which did not use a database evokes a collection of periodontal clinical parameters carried out by a research dental hygienist, which assumes a minimum of calibration, but does not state this.

It should be noted that some of the variables used in the selected studies correspond to common risk factors for both periodontitis and major NCD, and may induce errors in the interpretation of the relationship between these two processes. The measurable socio-economic covariates provide a limited range of socio-economic status over the course of life and could lead to residual confusion. However, the influence of socio-economic differences has been reduced by case matching and controls on race and ethnicity. Adjustment for chronological age alone may not capture residual confounders, due to age-related diseases that are variably distributed among people of similar age [28].

While some studies [28,29,31] refer to different stages of major NCD or different degrees of PD, none clearly use these data in their analysis or in a comparative manner between AD and PD, and only the presence or absence of PD and AD are actually used. For one study [31], the presence of PD means a moderate or severe stage, but it does not distinguish between the two. It would therefore have been interesting to be able to classify the diseases according to their stage of disease in order to make clear comparisons between the severity of major NCD and the severity of PD, especially as the suggested mechanisms linking PD or periodontal pathogens to cognitive impairment and major NCD are still speculative [30]. It is possible that participants with a faster rate of cognitive decline may become more susceptible to periodontitis by an unknown mechanism independent of the degree of cognitive impairment, or that periodontitis reflects a confounding factor such as an altered inflammatory or immune response, which is also a factor in the progression of AD. On the other hand, PD may be a direct factor in disease progression [31].

Furthermore, the sample sizes were not uniform and homogeneous between the different studies analyzed. With the exception of the Beydoun and al. study [30], a cross-sectional observational study that used a large sample of 6650 subjects, including 3251 people aged over 65 years, the sample sizes of the studies were always relatively small, which gives the studies little power and potentially increases the likelihood of false associations and lack of significance. Three studies were case-control studies and used small sample sizes. Panzarella et al. focused on 40 major NCD cases, including 20 AD cases and 20 controls [27]. The study by Noble et al. analyzed 110 cases and 109 controls [28]. The study by Syrjälä et al. observed 76 subjects with major NCD among them; 49 were AD cases and 278 were controls [29], thus leading to a lack of homogeneity between the number of cases and controls. The study by Ide et al. was a cohort study and included a small sample of 59 people with AD [31]. This sample and design variability between the different studies makes it difficult to compare results. Future studies should therefore reduce heterogeneity within and between groups [27].

#### 4.3. Periodontal Bacteria: Towards a Better Understanding of the Link

Several studies have shown that the clinical parameters for diagnosing periodontal disease and assessing its severity, such as PPD, CAL or BOP, are significantly increased in patients with AD [46–48]. Indeed, according to Gil de Montoya's study [48], the risk of cognitive disorders is three times higher for patients with severe PD compared to those who do not have it or who have moderate PD (OR = 3.04) (1.69–5.46). A pocket depth of more than 6 mm, which corresponds to severe periodontitis, would thus be associated with a 15 times greater risk of developing AD [49].

Furthermore, there appears to be a link between disease severity and cognitive decline [50], as patients with severe stage III and IV periodontitis have the lowest MMSE and CDT scores. However, this is refuted by other authors [49].

In addition, other authors stress the importance of the duration of periodontal disease. Patients with chronic periodontitis are reported to be at greater risk of developing AD [30,51]. Indeed, even if the study by Chen et al. [46] shows no statistically significant relationship between patients with periodontal disease and controls, a difference appears after 10 years of exposure to PD (OR 1.71, 95% CI (1.15–2.5"), and  $p = 0.0077$ ); patients exposed for a long time would then have 1.7 times more risk of developing AD than those with a healthy periodontium.

This may explain why some studies do not show a link between the two diseases, as it seems that cause precedes effect [52].

Genetics does not appear to be a causal factor in the link between the two diseases [53].

While there is currently no clinical evidence with which to describe a direct link between PD and AD, several studies propose indirect links. The two main hypotheses are inflammation and the bacteria involved. Periodontal pathogenic bacteria cause an inflammatory defense reaction in the host, leading to the production of inflammatory molecules such as IL-1B, IL-6, IL-8, and TNF. In advanced PD, the inflammatory cytokines are able to reach the central nervous system via the bloodstream, which is believed to influence the progression of AD [23,24,28,54–57].

Research into bacteria involved in the onset and/or progression of AD has highlighted many risk associations. *Pg*, a highly periodontal pathogenic bacteria, was the first to be incriminated. Its presence is thought to be linked to an increase in cognitive decline in patients and its presence in saliva is statistically linked to lower MMSE ( $p < 0.05$ ) and CDT ( $p = 0.056$ ) scores [50].

Other periodontopathogenic bacteria have been the subject of studies aimed at gaining a better understanding of their link with the onset and/or progression of Alzheimer's disease. The study by Beydoun et al. [58] reveals the synergy of many periodontopathogenic bacteria (*Pi*, *An*, *Pn*, *Pm*, *Pg*, *Td*, and *Tf*) with *Helicobacter pylori* and their impact on AD.

The role of *Pg* in the etiopathogenesis of AD has also been highlighted by Poole et al. [54] The bacterium, anti-*Pg* antibodies, and its lipopolysaccharides have been found in the brain and cerebrospinal fluid of patients with AD [24,54]. This means that *Pg* is able to bypass the immune system, reach the brain, and cross the brain barrier.

Recent study has proven the ability of periodontopathogenic bacteria to hijack the immune system [59]. They alter the function of macrophages and neutrophils. For example, during bacteremia caused by chewing, brushing teeth, or during treatment, they enter the brain via the bloodstream. To increase its virulence, *Pg* has the ability to secrete vesicles filled with proteases called gingipains. These have the function of breaking down cytokines to reduce inflammation. They use the tau protein present in the brain as a substrate. Its modification transforms the molecule into a neurotoxic product that contributes to the progression of AD. Gingipains can also be absorbed by neural cells to be detoxified. They will be transported from cell to cell throughout the neural system, spreading the infection that causes cognitive decline [59,60].

It should be noted that the improvement in the PI favorably modifies the oral microbiological composition [61–63] and could make it possible to reduce the incidence of pathogens in neuronal pathology. This hypothesis is a feasible means of attempting to reduce the incidence of major neurocognitive disorders in the elderly, and would justify oral health monitoring as well as more systematic dental management of the elderly.

Few studies currently have a high level of evidence on the link between AD and PD [64,65]. This link seems to be mainly described in animals, and when there are clinical studies in humans many of them only make a statement about periodontal status and AD without really analyzing it [46,49,52,65,66].

Moreover, studies often have small numbers of staff [23,29,49,50,52,66,67]. Larger, multi-center studies should be undertaken in this way.



Most studies analyze the link only at a point in the patient's life [23,28,29,46,47,49,50,53,58,67], but many authors suggest that periodontal diseases influence AD long before the first symptoms appear.

Finally, as many risk factors have been established with AD, risks of confounding bias are often described by the authors [30,46,51,58].

## 5. Conclusions

The literature currently seems to converge towards the affirmation of a link between periodontal diseases and Alzheimer's disease. Indeed, AD patients seem to have a lower level of oral hygiene and a higher risk of PD. In this context, periodontopathogenic bacteria have been found in AD patients, either associated with a higher risk of AD incidence or mortality, or inversely associated with these risks. Among them, *Pg*, *Fn*, *An*, and *Aa* seem to be the key bacteria. Nevertheless, further studies are still needed to better understand the origin and mechanisms of this interaction, as there are not yet enough studies with a high level of evidence on the subject. Thus, new studies that are better constructed and more rigorous in the diagnostic criteria of the pathologies studied are essential to try to better understand the association between AD and PD.

It seems fundamental to focus on this association, as a better understanding of it will allow the implementation of effective prevention and even treatment measures. Thus, the treatment of PD could represent a lever in a global strategy for the management of the prevalent and disabling disease that is AD.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijerph18179312/s1>, Table S1. PRISMA 2020 checklist, Table S2. Characteristics of the included studies, and Table S3. Main results of the included studies.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.B. and L.L.; methodology, L.B. and L.L.; formal analysis, L.B. and M.D.; writing—original draft preparation, L.B. and M.D.; writing—review and editing, L.B., M.D., L.L. and G.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Data Availability Statement:** No new data were generated.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Masson, E. Le Microbiote Buccal: Bases Fondamentales et Applications en Physiopathologie. Available online: <https://www.em-consulte.com/article/1340101/le-microbiote-buccal-bases-fondamentales-et-applic> (accessed on 29 April 2021).
2. Ezzo, P.J.; Cutler, C.W. Microorganisms as Risk Indicators for Periodontal Disease. *Periodontol 2000* **2003**, *32*, 24–35. [CrossRef] [PubMed]
3. Leask, A.; Holmes, A.; Black, C.M.; Abraham, D.J. Connective Tissue Growth Factor Gene Regulation. Requirements for Its Induction by Transforming Growth Factor-Beta 2 in Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13008–13015. [CrossRef] [PubMed]
4. Pizzo, G.; Guiglia, R.; Lo Russo, L.; Campisi, G. Dentistry and Internal Medicine: From the Focal Infection Theory to the Periodontal Medicine Concept. *Eur. J. Intern. Med.* **2010**, *21*, 496–502. [CrossRef]
5. Kurgan, S.; Kantarci, A. Molecular Basis for Immunohistochemical and Inflammatory Changes during Progression of Gingivitis to Periodontitis. *Periodontol 2000* **2018**, *76*, 51–67. [CrossRef]
6. Prince, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Ali, G.-C.; Wu, Y.-T.; Matthew, P. World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends. *Alzheimer's Dis. Int.* **2015**, *87*, 84.
7. World Health Organization. Global Burden of Disease 2004 Update: Disability Weights for Diseases and Conditions. Geneva: World Health Organization. Available online: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=World+Health+Organization.+Global+Burden+of+Disease+2004+Update%3A+Disability+Weights+for+Diseases+and+Conditions.+Geneva%3A+World+Health+Organization%3B+2004> (accessed on 30 April 2021).
8. Kent, S.A.; Spires-Jones, T.L.; Durrant, C.S. The Physiological Roles of Tau and A $\beta$ : Implications for Alzheimer's Disease Pathology and Therapeutics. *Acta Neuropathol.* **2020**, *140*, 417–447. [CrossRef] [PubMed]
9. Breijyeh, Z.; Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* **2020**, *25*, 5789. [CrossRef]
10. Armstrong, R. Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Folia Neuropathol.* **2019**, *57*, 87–105. [CrossRef] [PubMed]

11. Itzhaki, R.F.; Lathe, R.; Balin, B.J.; Ball, M.J.; Bearer, E.L.; Braak, H.; Bullido, M.J.; Carter, C.; Clerici, M.; Cosby, S.L.; et al. Microbes and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2016**, *51*, 979–984. [CrossRef]
12. Noble, J.M.; Borrell, L.N.; Papapanou, P.N.; Elkind, M.S.V.; Scarmeas, N.; Wright, C.B. Periodontitis Is Associated with Cognitive Impairment among Older Adults: Analysis of NHANES-III. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2009**, *80*, 1206–1211. [CrossRef]
13. Iacono, D.; Markesbery, W.R.; Gross, M.; Pletnikova, O.; Rudow, G.; Zandi, P.; Troncoso, J.C. The Nun Study: Clinically Silent AD, Neuronal Hypertrophy, and Linguistic Skills in Early Life. *Neurology* **2009**, *73*, 665–673. [CrossRef] [PubMed]
14. Eke, P.I.; Dye, B.A.; Wei, L.; Slade, G.D.; Thornton-Evans, G.O.; Borgnakke, W.S.; Taylor, G.W.; Page, R.C.; Beck, J.D.; Genco, R.J. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J. Periodontol.* **2015**, *86*, 611–622. [CrossRef] [PubMed]
15. Mattila, K.J.; Pussinen, P.J.; Paju, S. Dental Infections and Cardiovascular Diseases: A Review. *J. Periodontol.* **2005**, *76*, 2085–2088. [CrossRef] [PubMed]
16. Han, Y.W.; Houcken, W.; Loos, B.G.; Schenkein, H.A.; Tezal, M. Periodontal Disease, Atherosclerosis, Adverse Pregnancy Outcomes, and Head-and-Neck Cancer. *Adv. Dent. Res.* **2014**, *26*, 47–55. [CrossRef]
17. Ranjan, R.; Abhinay, A.; Mishra, M. Can Oral Microbial Infections Be a Risk Factor for Neurodegeneration? A Review of the Literature. *Neurol. India* **2018**, *66*, 344–351. [CrossRef]
18. Ashraf, G.M.; Tarasov, V.V.; Makhmutova, A.; Chubarev, V.N.; Avila-Rodriguez, M.; Bachurin, S.O.; Aliev, G. The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 4479–4491. [CrossRef]
19. Olsen, I.; Singhrao, S.K. Can Oral Infection Be a Risk Factor for Alzheimer's Disease? *J. Oral. Microbiol.* **2015**, *7*, 29143. [CrossRef]
20. Pritchard, A.B.; Crean, S.; Olsen, I.; Singhrao, S.K. Periodontitis, Microbiomes and Their Role in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 336. [CrossRef]
21. Miklossy, J.; McGeer, P.L. Common Mechanisms Involved in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes: A Key Role of Chronic Bacterial Infection and Inflammation. *Aging* **2016**, *8*, 575–588. [CrossRef]
22. Miklossy, J. Historic Evidence to Support a Causal Relationship between Spirochetal Infections and Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2015**, *7*, 46. [CrossRef]
23. Sparks Stein, P.; Steffen, M.J.; Smith, C.; Jicha, G.; Ebersole, J.L.; Abner, E.; Dawson, D. Serum Antibodies to Periodontal Pathogens Are a Risk Factor for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Dement.* **2012**, *8*, 196–203. [CrossRef] [PubMed]
24. Dominy, S.S.; Lynch, C.; Ermini, F.; Benedyk, M.; Marczyk, A.; Konradi, A.; Nguyen, M.; Haditsch, U.; Raha, D.; Griffin, C.; et al. Porphyromonas Gingivalis in Alzheimer's Disease Brains: Evidence for Disease Causation and Treatment with Small-Molecule Inhibitors. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaau3333. [CrossRef] [PubMed]
25. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *BMJ* **2021**, *372*, n71. [CrossRef] [PubMed]
26. Study Quality Assessment Tools/NHLBI, NIH. Available online: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/study-quality-assessment-tools> (accessed on 29 April 2021).
27. Panzarella, V.; Mauceri, R.; Baschi, R.; Maniscalco, L.; Campisi, G.; Monastero, R. Oral Health Status in Subjects with Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Data from the Zabùt Aging Project. *J. Alzheimer's Dis.* **2020**, *82*, 1–11. [CrossRef]
28. Noble, J.M.; Scarmeas, N.; Celenti, R.S.; Elkind, M.S.V.; Wright, C.B.; Schupf, N.; Papapanou, P.N. Serum IgG Antibody Levels to Periodontal Microbiota Are Associated with Incident Alzheimer Disease. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114959. [CrossRef]
29. Syrjälä, A.-M.H.; Ylöstalo, P.; Ruoppi, P.; Komulainen, K.; Hartikainen, S.; Sulkava, R.; Knuutila, M. Dementia and Oral Health among Subjects Aged 75 Years or Older. *Gerodontology* **2012**, *29*, 36–42. [CrossRef]
30. Beydoun, M.A.; Beydoun, H.A.; Hossain, S.; El-Hajj, Z.W.; Weiss, J.; Zonderman, A.B. Clinical and Bacterial Markers of Periodontitis and Their Association with Incident All-Cause and Alzheimer's Disease Dementia in a Large National Survey. *J. Alzheimer's Dis.* **2020**, *75*, 157–172. [CrossRef]
31. Ide, M.; Harris, M.; Stevens, A.; Sussams, R.; Hopkins, V.; Culliford, D.; Fuller, J.; Ibbett, P.; Raybould, R.; Thomas, R.; et al. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151081. [CrossRef]
32. Caton, J.G.; Armitage, G.; Berglundh, T.; Chapple, I.L.C.; Jepsen, S.; Kornman, K.S.; Mealey, B.L.; Papapanou, P.N.; Sanz, M.; Tonetti, M.S. A New Classification Scheme for Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions—Introduction and Key Changes from the 1999 Classification. *J. Periodontol.* **2018**, *89* (Suppl. 1), S1–S8. [CrossRef]
33. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D. Periodontal Microbial Ecology. *Periodontol 2000* **2005**, *38*, 135–187. [CrossRef]
34. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C.; Kent, R.L. Microbial Complexes in Subgingival Plaque. *J. Clin. Periodontol.* **1998**, *25*, 134–144. [CrossRef] [PubMed]
35. Nuckols, C.C.; Nuckols, C.C. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-V*, 5th ed.; American Psychiatric Association: Washington, DC, USA, 2013.
36. Folstein, M.F.; Folstein, S.E.; McHugh, P.R. "Mini-Mental State". A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. *J. Psychiatr. Res.* **1975**, *12*, 189–198. [CrossRef]
37. Molloy, D.W.; Standish, T.I. A Guide to the Standardized Mini-Mental State Examination. *Int. Psychogeriatr.* **1997**, *9* (Suppl. 1), 87–94, discussion 143–150. [CrossRef] [PubMed]

38. Bell, C.C. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV*, 4th ed.; American Psychiatric Association: Washington, DC, USA, 1994.
39. Segal, D.L. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR*, 4th ed.; American Psychiatric Association: Washington, DC, USA, 2000.
40. Rosen, W.G.; Mohs, R.C.; Davis, K.L. A New Rating Scale for Alzheimer's Disease. *Am. J. Psychiatry* **1984**, *141*, 1356–1364. [[CrossRef](#)]
41. McKhann, G.M.; Knopman, D.S.; Chertkow, H.; Hyman, B.T.; Jack, C.R.; Kawas, C.H.; Klunk, W.E.; Koroshetz, W.J.; Manly, J.J.; Mayeux, R.; et al. The Diagnosis of Dementia Due to Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Dement.* **2011**, *7*, 263–269. [[CrossRef](#)]
42. ICD-10-CM-International Classification of Diseases, Ninth Revision, Clinical Modification. Available online: <https://www.cdc.gov/nchs/icd/icd9cm.htm> (accessed on 30 April 2021).
43. Underlying Cause of Death 1999-2019. Available online: <https://wonder.cdc.gov/wonder/help/ucd.html> (accessed on 1 May 2021).
44. Lane, C.A.; Hardy, J.; Schott, J.M. Alzheimer's Disease. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25*, 59–70. [[CrossRef](#)]
45. Jack, C.R.; Bennett, D.A.; Blennow, K.; Carrillo, M.C.; Dunn, B.; Haeberlein, S.B.; Holtzman, D.M.; Jagust, W.; Jessen, F.; Karlawish, J.; et al. NIA-AA Research Framework: Toward a Biological Definition of Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Dement.* **2018**, *14*, 535–562. [[CrossRef](#)]
46. Chen, C.-K.; Wu, Y.-T.; Chang, Y.-C. Association between Chronic Periodontitis and the Risk of Alzheimer's Disease: A Retrospective, Population-Based, Matched-Cohort Study. *Alzheimer's Res. Ther.* **2017**, *9*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Martande, S.S.; Pradeep, A.R.; Singh, S.P.; Kumari, M.; Suke, D.K.; Raju, A.P.; Naik, S.B.; Singh, P.; Guruprasad, C.N.; Chatterji, A. Periodontal Health Condition in Patients with Alzheimer's Disease. *Am. J. Alzheimer's Dis. Other. Dement.* **2014**, *29*, 498–502. [[CrossRef](#)]
48. Gil-Montoya, J.A.; Sanchez-Lara, I.; Carnero-Pardo, C.; Fornieles, F.; Montes, J.; Vilchez, R.; Burgos, J.S.; Gonzalez-Moles, M.A.; Barrios, R.; Bravo, M. Is Periodontitis a Risk Factor for Cognitive Impairment and Dementia? A Case-Control Study. *J. Periodontol.* **2015**, *86*, 244–253. [[CrossRef](#)]
49. Holmer, J.; Eriksson, M.; Schultzberg, M.; Pussinen, P.J.; Buhlin, K. Association between Periodontitis and Risk of Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment and Subjective Cognitive Decline: A Case-Control Study. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 1287–1298. [[CrossRef](#)]
50. Leblhuber, F.; Huemer, J.; Steiner, K.; Gostner, J.M.; Fuchs, D. Knock-on Effect of Periodontitis to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease? *Wien. Klin. Wochenschr.* **2020**, *132*, 493–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Choi, S.; Kim, K.; Chang, J.; Kim, S.M.; Kim, S.J.; Cho, H.-J.; Park, S.M. Association of Chronic Periodontitis on Alzheimer's Disease or Vascular Dementia. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2019**, *67*, 1234–1239. [[CrossRef](#)]
52. Ship, J.A.; Puckett, S.A. Longitudinal Study on Oral Health in Subjects with Alzheimer's Disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1994**, *42*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sun, Y.-Q.; Richmond, R.C.; Chen, Y.; Mai, X.-M. Mixed Evidence for the Relationship between Periodontitis and Alzheimer's Disease: A Bidirectional Mendelian Randomization Study. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0228206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Poole, S.; Singhrao, S.K.; Kesavalu, L.; Curtis, M.A.; Crean, S. Determining the Presence of Periodontopathic Virulence Factors in Short-Term Postmortem Alzheimer's Disease Brain Tissue. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *36*, 665–677. [[CrossRef](#)]
55. Carter, C.J. Genetic, Transcriptome, Proteomic, and Epidemiological Evidence for Blood-Brain Barrier Disruption and Polymicrobial Brain Invasion as Determinant Factors in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis. Rep.* **2017**, *1*, 125–157. [[CrossRef](#)]
56. Carter, C.J.; France, J.; Crean, S.; Singhrao, S.K. The Porphyromonas Gingivalis/Host Interactome Shows Enrichment in GWASdb Genes Related to Alzheimer's Disease, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 408. [[CrossRef](#)]
57. Kamer, A.R.; Craig, R.G.; Pirraglia, E.; Dasanayake, A.P.; Norman, R.G.; Boylan, R.J.; Nehorayoff, A.; Glodzik, L.; Brys, M.; de Leon, M.J. TNF-Alpha and Antibodies to Periodontal Bacteria Discriminate between Alzheimer's Disease Patients and Normal Subjects. *J. Neuroimmunol.* **2009**, *216*, 92–97. [[CrossRef](#)]
58. Beydoun, M.A.; Beydoun, H.A.; Weiss, J.; Hossain, S.; El-Hajj, Z.W.; Zonderman, A.B. Helicobacter Pylori, Periodontal Pathogens, and Their Interactive Association with Incident All-Cause and Alzheimer's Disease Dementia in a Large National Survey. *Mol. Psychiatry* **2020**, 1–16. [[CrossRef](#)]
59. Singhrao, S.K.; Harding, A. Is Alzheimer's Disease a Polymicrobial Host Microbiome Dysbiosis? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2020**, *18*, 275–277. [[CrossRef](#)]
60. Singhrao, S.K.; Olsen, I. Are Porphyromonas Gingivalis Outer Membrane Vesicles Microbullets for Sporadic Alzheimer's Disease Manifestation? *J. Alzheimer's Dis. Rep.* **2018**, *2*, 219–228. [[CrossRef](#)]
61. Theilade, E.; Wright, W.H.; Jensen, S.B.; Løe, H. Experimental Gingivitis in Man. II. A Longitudinal Clinical and Bacteriological Investigation. *J. Periodontol. Res.* **1966**, *1*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ritz, H.L. Microbial Population Shifts in Developing Human Dental Plaque. *Arch. Oral. Biol.* **1967**, *12*, 1561–1568. [[CrossRef](#)]
63. Marsh, P.D.; Bradshaw, D.J. Dental Plaque as a Biofilm. *J. Ind. Microbiol.* **1995**, *15*, 169–175. [[CrossRef](#)]

64. Dioguardi, M.; Crincoli, V.; Laino, L.; Alovise, M.; Sovereto, D.; Mastrangelo, F.; Russo, L.L.; Muzio, L.L. The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Leira, Y.; Seoane, J.; Blanco, M.; Rodríguez-Yáñez, M.; Takkouche, B.; Blanco, J.; Castillo, J. Association between Periodontitis and Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. J. Epidemiol.* **2017**, *32*, 43–53. [[CrossRef](#)]
66. De Souza Rolim, T.; Fabri, G.M.C.; Nitrini, R.; Anghinah, R.; Teixeira, M.J.; de Siqueira, J.T.T.; Cestari, J.A.F.; de Siqueira, S.R.D.T. Oral Infections and Orofacial Pain in Alzheimer's Disease: A Case-Control Study. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, *38*, 823–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Laugisch, O.; Johnen, A.; Maldonado, A.; Ehmke, B.; Bürgin, W.; Olsen, I.; Potempa, J.; Sculean, A.; Duning, T.; Eick, S. Periodontal Pathogens and Associated Intrathecal Antibodies in Early Stages of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2018**, *66*, 105–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Supplementary Materials

Table S1. PRISMA 2020 Checklist.

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
<b>TITLE</b>			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	1
<b>ABSTRACT</b>			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	1
<b>INTRODUCTION</b>			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	2
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	2
<b>METHODS</b>			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	2-3
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	3
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	3
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	3
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	3
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	3
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	3
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	3
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	Table II
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	3
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	NA
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	NA
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	NA
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	NA
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	3
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	3

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	3
<b>RESULTS</b>			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	4
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	NA
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	4
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	5-6
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	Tables
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	Tables
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	NA
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	5-6
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	Figures 2 and 3
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	4-5
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	Table II
<b>DISCUSSION</b>			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	9-10-11
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	8-9
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	7-8
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	7-8-9-10
<b>OTHER INFORMATION</b>			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	2
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	NA
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	2
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	11
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	11
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	11

NA, Not Applicable

**Table S2.** Characteristics of the included studies

Author and year	Type of study	Protocol	Characteristics of participants	Diagnosis method of AD	Diagnosis criteria of PD	Covariates studied
Panzarella et al. 2020, J Alzheimers Dis (27)	Case control study	Data from the "Zabut Aging Project" (Italy) :  20 AD / 20 aMCI / 20 controls	Women = 55 %  Men = 45%  Mean age = 80 ± 8,68 yo, no significant differences between groups	Tests used:  MMSE, DSM IV-TR, MRI	<b>Bacterial criteria:</b> bacterial load for <i>Aa, Fn, Pg, Pi, Td, Tf</i>  <b>Periodontal criteria:</b>  -CPI = BoP, dental calculus, PPD  -PSR = mobility, muco-gingival damage, recessions >3.5 mm  -Abscess, halitosis, pain	Age, sex, tobacco, alcohol, level of education, obesity (body mass index = BMI), hypertension, diabetes, cholesterol, heart disease, DMFT, APoE Allele, hs-CRP
Noble et al. 2014, Plos One (28)	Case control study	Data from the "multiethnic elderly community population" Manhattan (USA)  - 110 patients with AD when phlebotomy and follow-ups  - 109 controls: no AD/ major NCD at last follow-up	Control women = 73 (67%)  Case = 75 (68.2%)  Mean age of controls = 72 yo (s.d. 6.9)  Mean age of cases = 79 yo (s.d. = 4.6) (p<0.001)	Data from the WHICAP study  NINCDS-ADRDA DSM-IV  Tests used:  neuropsychological tests, MMSE	<b>Bacterial criteria:</b> Serum IgG antibody level against <i>Pg, Tf, Aa, Td, C, En, An</i> with definition of a threshold value	Age, gender, ethnicity, tobacco, grade level, ApoE e4 allele presence, vascular risk, hypertension, diabetes, diabetes, hyperlipidemia, stroke, heart disease
Syrjälä et al. 2012, Gerontology (29)	Case control study	Population over 75 yo Kuopio (Finland) N = 354  - 278 Controls  - 49 Cases with AD  - 16 Cases with VD  - 11 Cases with other types of major NCD	Women = 71.5%  - Control women = 71.2%  - AD women = 83.7%  - VD women = 56.2%  - Other types = 45.5%  Mean age = 82.0 yo (4.9)	Test used:  DSM-IV	<b>Periodontal criteria:</b> PI, PPD, number of teeth	Age, gender  level of education  tobacco, place of residence, marital status

			Mean age without major NCD = 81.4 yo (4.6)  Mean age with AD = 84.8 yo (5.6)  Mean age with other types of dementia = 85.3 yo (4.8)			
<b>Beydoun MA. et al. 2020, J Alzheimers Dis (30)</b>	Cross-sectional observational study	<b>Data</b> from NHANES III (USA): patients over 45 yo (n = 9787)  in which N = 3251 over 65 yo with complete medical data and known mortality	% of men = 41.4 +/- 1.12  Mean age = 73.6 +/- 0.24 yo	AD diagnosed with ICD-9 code 331.0  Underlying cause of death is AD with ICD-10 code G30	<b>Bacterial criteria:</b> Complete serum IgG data against at least 1 of the 19 following periodontal bacteria: <i>Aa, Pg, Tj, Td, Cr, En, Pi, Pn, Pm, Fn, Mm, Sn, Ec, Co, Si, So, Sm, Vp, An</i>  <b>Periodontal Criteria:</b> CAL, PPD	Age, ethnicity, alcohol, drugs, tobacco, co-morbidity index, allostatic load, educational attainment, income, marital status, nutritional factors and markers, self-rated health, place of residence, weight, sport activity, sex, size of dwelling, self-rated health
<b>Ide et al. 2016, Plos One (31)</b>	Longitudinal prospective study  = observational cohort study	Recruitment for clinical referral to memory assessment services (Southampton, UK): non-smokers, mild to moderate AD, at least 10 teeth, no periodontal care in the last 6 months: N = 59  Re evaluation N +6 months = 52	% of men = 30 (51%)  Mean age = 77,7 yo (s.d. 8,6)	AD diagnosed with the NINCDS-ADRDA criteria  Tests used:  cognitive tests (ADAS-cog), sMMSE,  blood tests (CRP, pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ , anti-inflammatory IL10, Anti Pg antibodies)	<b>Bacterial criteria :</b> CRP, pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ , anti-inflammatory cytokine IL-10, Ac anti <i>Pg</i>  <b>Periodontal criteria:</b> PI, GI, BoP, PPD, number of teeth (Centre for Disease Control/American Academy of Periodontology)	Age, gender, smoking, initial cognitive status

**Cognitive diseases and diagnosis criteria:** AD, Alzheimer's disease; aMCI, amnesic Mild Cognitive Impairment; NCD, Neurocognitive Disorder; VD, Vascular Disease; ADAS-cog, Alzheimer's Disease Assessment Scale cognitive component; DSM-IV, Diagnostic and statistical Manual of Mental Disorders, 4<sup>th</sup> version; DSM-V, Diagnostic and statistical Manual of Mental Disorders 5<sup>th</sup> version; ICD-9, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 9<sup>th</sup> version; ICD-10, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10<sup>th</sup> version; MMSE, Mini Mental State Examination; MRI Magnetic Resonance Imaging; NINCDS-ADRDA, National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria; sMMSE, severe Mini Mental State Examination;

APoE, Apolipoprotein E $\epsilon$ 4 allele; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; IL-10, anti-inflammatory cytokine IL10; TNF  $\alpha$ , pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ ;

**Cofactors:** BMI, Body Mass index;

**Periodontal and oral criteria:** BoP, Bleeding on probing; CAL, Clinical Attachment Loss; CPI, Community Periodontal Index; DMFT, Decayed Missing and Filled Teeth index; PPD, Probing Pocket Depth; PSR, Probing Screening and Recording index; PI, Plaque Index; GI, gingival index;

**Pathogens:** *Aa*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*; *An*, *Actinomyces naeslundii*; *Co*, *capnocytophaga ochracea*; *Cr*, *Campylobacter rectus*; *Ec*, *Eikenella corrodens*; *En*, *Eubacterium nodatum*; *Fn*, *Fusobacterium nucleatum*; *Mm*; *Micromonas micros*; *Pg*, *Porphyromonas gingivalis*; *Pi*, *Prevotella intermedia*; *Pm*, *Prevotella melaninogenica*; *Pn*, *Prevotella nigrescens*; *Si*, *Streptococcus intermedius*; *So*, *Streptococcus oralis*; *Sm*, *Streptococcus mutans*; *Sn*, *Selenomonas Noxia*; *Td*, *Treponema denticola*; *Tf*, *Treponema forsythia*; *Vp*, *Vellonella parvula*;

**Statistics and others:** p, p value; s.d., standard deviation; yo, years old.



Table S3. Main results of the included studies

AUTHOR AND YEAR	MAIN RESULTS	ODDS RATIO	RELATIVE RISK	SIGNIFICANCE
<p>Panzarella et al. 2020, J Alzheimers Dis (27)</p>	<p>1)Patients with AD having a poorer oral health and significantly higher DMFT total score than aMCI (adjusted p = 0.009) and CONS (adjusted p = 0.001)</p> <p>2) Significantly different <i>Fn</i> load in AD and in CONS (p = 0.04) and after <i>post-hoc</i> analysis significantly higher <i>Fn</i> load in AD than in CONS (adjusted p = 0.02) and bacterial load of <i>Td</i> higher in aMCI than in AD (adjusted p = 0.004)</p> <p>3)Diagnosis of AD predictive of tooth loss, especially in 80 yo or older subjects</p>	<p>X</p>	<p>X</p>	<p>Periodontal characteristics and AD:</p> <p>CPI p = 0.89 n.s.</p> <p>PSR p = 0.91 n.s.</p> <p>BoP p = 0.11 n.s.</p> <p><i>Aa</i> p = 0.39 n.s.</p> <p><i>Fn</i> p = 0.04 AD&gt;CONS</p> <p><i>Pg</i> p = 0.57 n.s.</p> <p><i>Pi</i> p = 0.12 n.s.</p> <p><i>Td</i> p = 0.01 aMCI&gt;AD</p> <p><i>Tf</i> p = 0.45</p>
<p>Noble et al. 2014, Plos One (28)</p>	<p>1) Participants with elevated <i>An</i> serum IgG (.640 ng/ml) had a higher risk for incident AD, ranging from 80%–100%, with similar yet less precise estimates emerging from more conservative statistical analyses</p> <p>remained robust in the fully adjusted Cox model, (age, sociodemographic variables, vascular risk factors, APoE status, stroke history, tobacco abuse, hypertension) (HR)2.0, 95% CI: 1.1–3.8</p> <p>2) In a fully adjusted model, high antibody levels to <i>En</i> (.1755 ng/ml) approached statistical significance with a decreased risk of incident AD ((HR)0.7, 95% CI: 0.4–1.2)</p>	<p>Multivariate analysis:</p> <p><i>An</i> Model 4 HR (95% CI) 2.0 (1.1-3.8)</p> <p><i>En</i> Model 3 HR (95% CI) 0.7 (0.4-1.2)</p>	<p>X</p>	<p>Periodontal characteristics and AD:</p> <p><i>An</i> p = 0.67</p> <p><i>En</i> p = 0.47</p> <p><i>Pg</i> p = 0.97</p> <p><i>Tf</i> p = 0.29</p> <p><i>Td</i> p = 0.25</p> <p><i>Cr</i> p = 0.33</p> <p><i>Aa</i> p = 0.30</p>

<p>Syrjälä et al. 2012, Gerontology (29)</p>	<p>After adjustment for potential confounding factors, persons with AD and persons with other types of major NCD had an increased likelihood of having teeth with deep periodontal pockets and poor oral hygiene, compared with CONS</p>	<p>Univariate analysis: Number of teeth with periodontal pockets <math>\geq 4</math> mm (mean <math>\pm</math> SD) Non demented 2.9 (3.8) AD 2.8 (3.3) Multivariate analysis: Number of teeth with periodontal pockets (n = 174) – adjusted RR (0.95% CI) Non demented 1 AD 4.7 (3.5-6.3) Other types 4.2 (2.4-7.5)</p>	<p>X</p>	<p>X</p>
<p>Beydoun MA. et al. 2020, J Alzheimers Dis (30)</p>	<p>-IgG against <i>Pg</i>, <i>Pm</i>, Orange-red complex, factor 2 and <i>Si</i> linked to the increase in mortality due to AD in the over 65 yo, this was also true for <i>So</i> in men, while the reverse was true for IgG against <i>Aa</i> -IgG against <i>Pg</i>, <i>Cr</i> and factor 4 linked to an increased risk of AD incidence in people over 65yo, <i>So</i> increases the risk of major NCD in men, <i>Ec</i> increases the risk of major NCD in women Reverse true for anti <i>Aa</i> IgG (over 65 yo), and for <i>Si</i> which was marginally and inversely associated with the risk of AD incidence in women -Evidence of an association between periodontal pathogens and AD, stronger for older adults -Adds epidemiological evidence suggesting that eradication of <i>Pg</i> could</p>	<p>Multivariate analysis: Periodontal pathogens and mortality due to AD in the over 65s (Loge (HR) (SE)) <i>Pg</i> +0.31 (0.11) 0.010 <i>Pm</i> +0.55 (0.19) 0.005 Orange-red complex +0.56 (0.17) 0.002 Periodontal pathogens and risk of AD incidence in people over 65 yo: Factor 4 loaded highly on <i>Cr</i> and <i>Pg</i> titers (aHR=1.22; 95% CI, 1.04-1.43, p=0.012)</p>	<p>X</p>	<p>Periodontal pathogens and mortality due to AD over 65 yo <i>Pg</i> p = 0.010 <i>Pm</i> p = 0.005 Red-orange complex p = 0.002 Periodontal pathogens and risk of AD incidence over 65 yo Factor 4 (<i>Pg/Cr</i>) p = 0.012</p>

	be an effective means of delaying the onset of AD			
Ide et al. 2016, Plos One  (31)	<p>-No clear relation between severity of major NCD and degree of periodontitis, (No subjects with severe major NCD)</p> <p>-In AD a bad dental health (periodontitis) is associated with an increase of cognitive decline over a 6 months follow-up period (mean change in the ADAS-cog 2.9 (s.d. 6.6) pts), independently of the basic cognitive state</p> <p>-Absence of relationship between low number of teeth (past periodontitis) and cognitive decline: chronic active periodontitis is the most important in the conduct of cognitive decline once AD established</p> <p>-No significant relationship between serum levels of anti-Pg antibodies and rates of cognitive decline</p> <p>-Evidence of a relative increase in pro-inflammatory status and a decrease in anti-inflammatory status over a 6-month follow-up period in participants with AD and periodontitis</p> <p>-If there is a direct relationship between periodontitis and cognitive decline, treatment of periodontitis could be a possible treatment option in AD</p>	<p>Multivariate analysis Mean difference and p value:</p> <p>1. Presence or absence of periodontitis at baseline and change in ADAS-cog, points 5.2 (1.7 to 8.8), p = 0.005; *4.9 (1.2 to 8.6), p = 0.01</p> <p>2. Presence or absence of periodontitis at baseline and change in sMMSE, points -1.8 (-3.6 to -0.03), p = 0.04; *-1.8 p = 0.06</p>	X	<p>Multivariate analysis Mean difference and p value:</p> <p>1. Presence or absence of periodontitis at baseline and change in ADAS-cog, points 5.2 (1.7 to 8.8), p = 0.005; *4.9 (1.2 to 8.6), p = 0.01</p> <p>2. Presence or absence of periodontitis at baseline and change in sMMSE, points -1.8 (-3.6 to -0.03), p = 0.04; *-1.8 p = 0.06</p>

**Cognitive diseases and diagnosis criteria:** AD, Alzheimer's disease; aMCI, amnesic Mild Cognitive Impairment; CONS, Controls;

ADAS-cog, Alzheimer's Disease Assessment Scale cognitive component; sMMSE, severe Mini Mental State Examination;

ApoE, Apolipoprotein E;

**Periodontal and oral criteria:** CPI, Community Periodontal Index; BoP, Bleeding on probing; DMFT, Decayed Missing and Filled Teeth index; IgG, Immunoglobulin G; PSR, Probing Screening and Recording index;

**Pathogens:** Aa, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*; An, *Actinomyces naeslundii*; Cr, *Campylobacter rectus*; Ec, *Eikenella corrodens*; En, *Eubacterium nodatum*; factor 2, *Pi,Pn,Pm*; factor 4, *Pg,Cr*; Fn, *Fusobacterium nucleatum*; Orange-red complex, *Pm, Pi, Pn, Pg*; Pg, *Porphyromonas gingivalis*; Pi, *Prevotella intermedia*; Pm, *Prevotella melaninogenica*; Pn, *Prevotella nigrescens*; Si, *Streptococcus intermedius*; So, *Streptococcus oralis*; Td, *Treponema denticola*; Tf, *Treponema forsythia*;

**Statistics and others:** CI, Confidence Interval; HR, Hazard Ratio; n.s., non significant; p, p value; RR, Relative Risk; SD, Standard Deviation; yo, years old

## **PARTIE 4 : IMPLICATION DES HERPES VIRUS ORAUX DANS LA PATHOGENESE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.**

### **A. Classification des HHV**

Parmi la centaine d'herpèsvirus au moins partiellement caractérisés, seuls huit infectent l'homme :

- HHV1 : Herpès simplex virus de type 1, HSV-1
- HHV2 : Herpès simplex virus de type 2, HSV-2
- HHV3 : Virus de la varicelle ou du zona, VZV
- HHV4 : Epstein Barr virus, EBV
- HHV5 : Cytomégalovirus, CMV
- HHV6 : Herpès virus humain 6A et 6B, HHV6A et HHV6B
- HHV7 : Herpès virus humain 7, HHV7
- HHV8 : Herpès virus associé au sarcome de Kaposi, KSHV.

Ces HHV sont classés dans la famille des Herpesviridae (108) et répartis en trois sous-familles :

- Alpha herpesvirus ou Alphaherpesvirinae : caractérisés par un cycle reproductif extrêmement court (quelques heures), une destruction rapide de la cellule infectée et une capacité à se répliquer dans une large variété de tissus de l'hôte et comprenant HSV-1 et -2 et le VZV.
- Beta herpesvirus ou Betaherpesvirinae : caractérisés par un cycle de multiplication long (15 jours), avec une infection progressant lentement dans les cellules et comprenant CMV, HHV-6 et HHV-7.
- Gamma herpesvirus ou Gammaherpesvirinae : ayant un nombre très limité de cibles cellulaires et comprenant EBV et HHV-8.

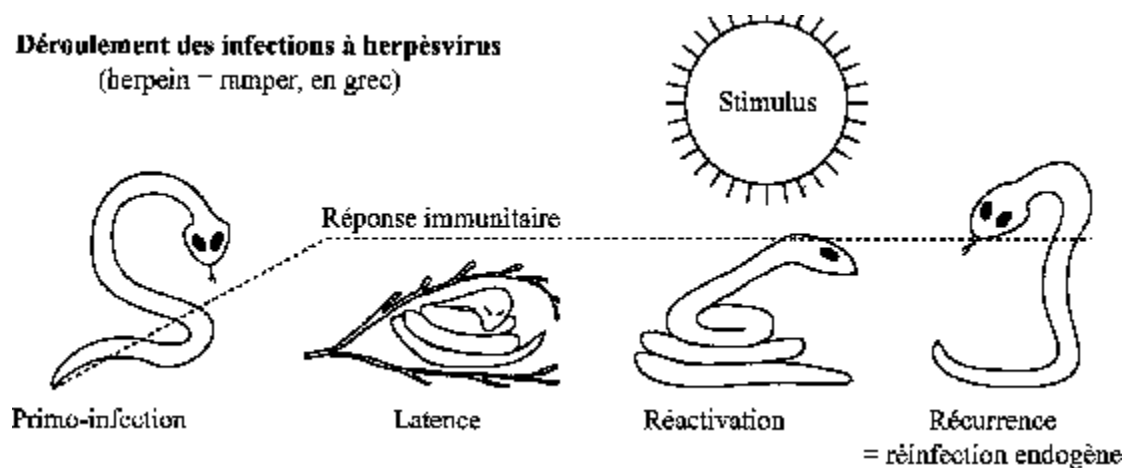
Il s'agit de virus à ADN possédant des génomes d'assez grande taille (120 à 130 kilo paires de bases) qui contiennent un nombre élevé de gènes capables de produire environ une centaine de protéines au cours du cycle répliatif. La présence d'une enveloppe assez labile explique certaines caractéristiques épidémiologiques de la transmission interhumaine qui nécessite des contacts étroits par transmission de fluides corporels. Après l'infection initiale, ces virus restent latents dans les cellules hôtes spécifiques et peuvent ultérieurement se réactiver. Les syndromes cliniques dus à la primo-infection peuvent être très différents de ceux provoqués par la réactivation de ces virus. Malgré le fait qu'ils soient génétiquement et structurellement similaires, ils provoquent un large éventail de syndromes cliniques généralement non chevauchants.

La réplication de l'ADN viral est très différente de celle de l'ADN cellulaire car elle exige la présence d'une ADN polymérase d'origine virale. Les traitements anti-herpétiques actuellement disponibles sont pour la plupart des dérivés de l'acyclovir qui sont métabolisés préférentiellement par les polymérases des herpès virus et bloquent l'étape de réplication.

Contrairement à d'autres HHV qui ne sont pas associés à une tumeur maligne, l'EBV et le HHV-8, également connu sous le nom d'herpes virus associé au sarcome de Kaposi (KSHV), peuvent provoquer certains cancers.

Du point de vue étymologique, herpès vient du grec et implique l'idée de ramper comme un serpent. En effet, une caractéristique essentielle des infections à herpes virus est de persister à vie dans l'organisme après la phase de primo-infection ; le virus reste tapi sous une forme "dormante" mais il conserve la capacité d'être activé à tout moment pour «surgir » de façon brutale et soudaine (figure 13). La phase de dormance désignée comme une "infection latente" permet au virus d'échapper à l'immunité du fait que le virus en latence n'exprime quasiment aucun antigène susceptible d'alerter l'immunité. Ace stade seul le génome viral ADN (épisode viral) se maintient dans la cellule infectée de façon autonome, notamment au cours des mitoses de la cellule hôte. Pour des raisons variées (fatigue, stress, inflammations) et l'infection latente peut se réactiver rapidement avec accomplissement du cycle viral complet et productions de nouveaux virons donnant alors une réinfection endogène, ce qu'on appelle une récurrence. Les récurrences sont l'occasion d'une excrétion virale, souvent asymptomatique, assurant l'infection de nouveaux hôtes.

**Déroulement des infections à herpesvirus**  
(herpein = ramper, en grec)



**Figure 13 :** Déroulement des infections à herpesvirus (109)

Ainsi au cours d'une co-évolution sur des millions d'années, homme et herpesviridae ont trouvé un modus vivendi leur évitant la destruction mutuelle. Il est cependant remis en question en cas d'immunodépression, qui majore les manifestations cliniques de l'infection par herpesviridae.

**B. Données générales sur les HHV**

1. HSV-1 et HSV-2

L'infection par HSV-1 se déroule en trois phases :

1. Primo-infection
2. Latence
3. Réactivations

La primo-infection à HSV-1, souvent asymptomatique, survient en général dans l'enfance (110) par contact cutanéomuqueux généralement étroit avec un sujet humain excréteur du virus (111,112). Ce virus est responsable d'atteintes de la partie haute du corps (muqueuses bucco-pharyngées, oculaires, nasales, peau) et la transmission se fera notamment par la salive. Les lésions de type herpès génital sont souvent en lien avec une infection à HSV-2 dont la transmission s'effectuera principalement lors de rapports sexuels. Il existe toutefois des atteintes génitales à HSV-1 et des atteintes bucco-pharyngées à HSV-2 (113).

Après la primo-infection, le virus va rester dans l'organisme sous une forme latente cliniquement asymptomatique.

Il va ensuite se périodiquement se réactiver, soit de manière asymptomatique soit de manière symptomatique (récurrences herpétiques).

## 2. HHV3 ou VZV

Le réservoir du VZV est strictement humain. Il a capacité à induire 2 pathologies distinctes : la varicelle et le zona. Après une primo-infection (varicelle) provoquant une éruption typique (114), une phase de latence s'installe, avec des opportunités de réactivation (zona) notamment favorisées par une diminution de l'immunité, un stress ou encore une autre infection, ce qui expliquerait sa fréquence chez les sujets immunodéprimés et en particulier séropositifs pour le virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).

Chez le patient immunocompétent, La primo-infection se manifeste généralement par des symptômes généraux (fièvre, myalgies) suivis de l'éruption typique généralement vers le dixième jour de l'infection. Le diagnostic est essentiellement clinique. Les complications neurologiques type encéphalite, méningite ou myélite (115,116) sont rares. Le patient immunodéficient (VIH au stade SIDA (117), transplantés (118,119) ou sous immunosuppresseurs) est quant à lui plus à risque de complications et de mortalité. La réactivation du virus se traduit par des signes essentiellement neurologiques. Il peut également exister des lésions de zona concomitantes. Lorsque le système nerveux central est atteint, une méningite en est la manifestation classique, mais l'encéphalite et la myélite transverse sont également décrites (120,121). Les patients immunodéficients sont plus à risque de zona disséminé. La réactivation peut dans leur cas également se manifester sous forme d'atteinte multisystémique avec pneumonie, hépatite, pancréatite ou méningo-encéphalite.

## 3. HHV4 ou EBV

Le virus EBV est ubiquitaire et infecte la grande majorité de la population mondiale (95% des adultes présentent des anticorps anti-EBV), généralement sous la forme d'une infection asymptomatique chez l'enfant, puis il persiste toute la vie à l'état latent dans les lymphocytes B de l'organisme (122). Une réactivation virale périodique pourra survenir, en particulier en présence d'une immunité amoindrie.

Le virus infecte les cellules épithéliales du pharynx et des glandes salivaires. L'infection par EBV est ainsi le plus souvent transmise par la salive, permettant une diffusion du virus dans la sphère

oropharyngée [123], mais d'autres modes de transmission sont possibles, par transfusion sanguine [124], lors des greffes d'organes [125] et des transferts entre la mère et l'enfant pendant la grossesse ou lors de l'allaitement [126,127].

EBV est un des principaux agents responsables de la mononucléose infectieuse (MNI) avec le CMV, le VIH et *Toxoplasma Gondii*. La MNI associe des signes cliniques (fièvre, asthénie, angine et adénopathies) et des signes biologiques non spécifiques (syndrome mononucléosique, cytolyse hépatique et anticorps hétérophiles).

Une primo-infection tardive à l'âge adulte entrainera dans la moitié des cas une MNI. Il est également impliqué dans la pathogénie de plusieurs cancers chez l'homme immunocompétent (128,129) tels le lymphome de Burkitt et le carcinome naso-pharyngé.

#### 4. HHV5 ou CMV

L'homme est le seul réservoir connu du CMV humain, qui est un virus endémique.

On peut observer deux pics de contamination: un premier au cours des premières années de vie (infection materno-fœtale et en crèches) et un second au début de la vie sexuelle active. La plupart des liquides biologiques représentent des sources de contamination. Ce sont les sécrétions naso-pharyngées, les urines, les sécrétions vaginales, le lait maternel, les selles, le sperme, les larmes et le sang. Le CMV ne résiste pas dans le milieu extérieur et est transmis par contact étroit entre individus. La transmission inter-humaine en collectivité ou en famille s'effectue ainsi par le biais des gouttelettes de sécrétions respiratoires ou salivaires. Chez le sujet immunocompétent, l'infection à CMV est le plus souvent asymptomatique. Dans de rares cas, des complications peuvent survenir (pneumopathie, myocardite, méningite aseptique ou syndrome de Guillain-Barré) (130). L'infection congénitale à CMV est courante et se produit pour 0,5 à 2% des naissances. Les patients immunodéprimés et transplantés représentent comme les nouveaux-nés une population à risque pour lesquels l'infection au CMV peut être source de morbidité et de mortalité.

Après contamination, le virus va se disséminer dans tout l'organisme (131) par contiguïté, de cellule à cellule. Les fibroblastes, cellules des tissus conjonctifs, représentent une cible majeure du virus. La multiplication du virus dans les organes est lente.

Après une primo-infection, le CMV, comme tous les herpesvirus, persiste dans l'organisme et alterne entre épisodes de latence et de réactivation. Alors que la primo-infection est souvent accompagnée d'une période limitée de maladie clinique, la latence à long terme est asymptomatique.

L'atteinte des cellules du système nerveux central et des neurones périphériques est à l'origine de manifestations neurologiques (132).

#### 5. HHV6A et 6B et HHV7 (133)

Les herpes virus humains 6A, 6B et 7 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7) sont génétiquement proches du CMV. Ils infectent les lymphocytes T, mais aussi les monocytes/macrophages, certaines cellules

épithéliales et les cellules du système nerveux central. Ces virus sont ubiquistes et provoquent une infection chronique à vie, le plus souvent asymptomatique, chez la quasi-totalité de la population générale adulte. Les êtres humains sont les seuls hôtes de ces virus (134). Ils se transmettent principalement par la salive, très tôt dans la vie, même si d'autres voies de transmission sont possibles telles le lait maternel (135) ou une transmission in utero. Le HHV-6B est responsable de l'exanthème subit, maladie bénigne du très jeune enfant. Les HHV-6A et HHV-6B sont responsables d'infections opportunistes chez les patients immunodéprimés (...). Leur rôle étiologique dans des maladies chroniques comme sclérose en plaque, myocardites ou thyroïdites est encore controversé. La pathogénicité du HHV-7 est moins connue et paraît beaucoup plus restreinte. L'intégration chromosomique des HHV-6A et HHV-6B est transmissible de façon héréditaire et concernent environ 1% de la population générale. Elle pose la question des éventuelles maladies associées et peut être un facteur de confusion pour le diagnostic des infections actives par ces deux virus.

#### 6. HHV8 ou KSHV (136)

Le HHV-8 est aussi nommé virus herpès associé au Sarcome de Kaposi (KSHV), car considéré comme agent étiologique de la maladie de Kaposi. Il présente, comme le virus EBV, des propriétés oncogènes. La distribution de ce virus est non ubiquitaire, avec une séroprévalence allant de 5% dans la population adulte des pays occidentaux jusqu'à plus de 50% en Afrique.

Si la transmission peut se faire par voie sexuelle ou de la mère à l'enfant, la salive semble être un réservoir viral majeur, ainsi la présence du virus dans la salive est documentée (137-139).

### C. Herpès virus, cavité orale et maladie d'Alzheimer

La cavité buccale héberge de nombreux herpès virus humains. Il a en outre été démontré que ces virus pouvaient se répliquer activement dans les lésions parodontales, jouant ainsi un rôle majeur dans la parodontite (140,141). Des travaux précédemment menés au laboratoire MICORALIS ont apporté des contributions significatives à la compréhension de l'implication d'EBV en pathogénèse orale (140-143). De récentes études apportent également des données nouvelles en faveur d'une implication des HHV dans la MA et d'autres maladies neurologiques (144,145).

#### 1. Herpès virus et maladies parodontales

Les modifications défavorables de la dent et de son environnement entraînent des complications parodontales. La pathogénie des maladies parodontales est considérée comme un processus à plusieurs étapes impliquant des interactions complexes entre HHV, bactéries, facteurs de l'hôte et facteurs environnementaux modulateurs de la maladie (146,147). Les HHV sont par exemple connus pour augmenter la gravité de la maladie chez les patients parodontaux (148), et, des études concernant principalement HSV-1, EBV, CMV et HHV-7, ont montré une association significative entre ces derniers et les maladies parodontales (149).



Parmi les facteurs de risque des gingivites non induites par la plaque, des virus tels que HSV-1, VZV, EBV, HPV sont cités (150). Ces affections gingivales non induites par la plaque englobent une variété d'affections qui ne disparaissent généralement pas après élimination de la plaque. De telles lésions peuvent représenter des manifestations d'un état systémique et peuvent être localisées dans la cavité buccale. Bien que ces lésions ne soient pas causées par le biofilm de la plaque dentaire, la sévérité des manifestations cliniques dépend souvent de l'accumulation de plaque.

HSV-1 et EBV sont aussi retrouvés associés à la parodontite chronique (151,152), alors que EBV HSV1 HHV6 et CMV seraient associés à la GUN et VZV pourrait contribuer à une nécrose du parodonte et de l'os mandibulaire (153). Le VZV serait ainsi à l'origine de complications orales graves et d'errances diagnostiques. En 2010, un article a rapporté le premier cas de fracture pathologique de la mandibule après une infection par le virus Herpes Zoster (HZ) impliquant la division mandibulaire du nerf trijumeau (154), démontrant ainsi les complications post-herpétiques d'ostéonécrose, d'exfoliation spontanée des dents et de fracture pathologique subséquente de la mandibule en l'absence de facteurs prédisposants concomitants chez un homme de 65 ans, et mettant en évidence les graves complications buccales potentielles de l'infection à HZ lorsque le diagnostic et le traitement sont retardés, incitant les cliniciens à reconnaître les caractéristiques précoces de l'HZ et à fournir rapidement un traitement antiviral pour prévenir ces complications.

L'article passe également en revue les cas d'ostéonécrose et d'exfoliation spontanée des dents précédemment présentés dans la littérature. L'implication osseuse et l'exfoliation dentaire spontanée dans l'infection zostérienne du cinquième nerf crânien sont assez rares (155). En effet jusqu'en 2009 la nécrose alvéolaire post-zostérienne et l'exfoliation dentaire spontanée ont été décrites dans 41 cas. Les âges étaient compris entre 6 et 85 ans, avec une croissance du nombre de cas avec l'avancée en âge. L'augmentation de la fréquence de l'infection zoonotique avec l'âge pourrait être due à la disparition des anticorps neutralisant le zona qui persistent généralement pendant 40 ans après l'attaque initiale de la varicelle (156).

Un autre article datant de 2017 (157) a quant à lui mis en évidence les caractéristiques distinctives d'une infection gingivale secondaire à la varicelle chez une femme âgée de 58 ans. Celle-ci présentait une sensation de brûlure et une douleur aiguë, unilatérale et persistante de la gencive avec une lésion vésiculobulleuse desquamante. L'herpès zoster affectant la gencive sans aucune lésion dermique est un état pathologique rare et ambiguë créant un dilemme diagnostique. Il peut se manifester sous forme de lésions vésiculaires desquamatives douloureuses, d'une affection pulpaire ou d'une autre affection névralgique douloureuse chez les personnes âgées, nécessitant un diagnostic précis avant de formuler un plan de traitement approprié.

EBV et CMV font ainsi partie des herpès virus régulièrement retrouvés associés à la parodontite dans la littérature. En effet, une étude récente (158) a montré un taux de détection de l'EBV et de CMV

significativement plus élevés chez les patients atteints de formes sévères de parodontite. Cette étude, qui a analysé par réaction en chaîne par polymérase en point final (end-point polymerase chain reaction analyses) des échantillons subgingivaux prélevés sur des sites actifs de la parodontite, a pu montrer que l'occurrence de l'EBV était significativement plus élevée chez les patients atteints de parodontite ulcéro-nécrotique (PUN), et que le CMV était détecté significativement plus fréquemment chez les patients présentant un abcès parodontal et les patients avec PUN.

Une autre étude (148) avait notamment pour objectif de révéler l'association du virus de l'herpès avec les paramètres parodontaux. Les 120 patients inclus ont été divisés en trois groupes : I (sain), II (parodontite sans diabète de type 2) et III (parodontite avec diabète de type 2). Sur les échantillons subgingivaux prélevés, la présence d'EBV et du CMV a été détectée à l'aide d'amorces de réaction en chaîne par polymérase multiplex. Des niveaux significatifs d'EBV ont été détectés dans le groupe III (n = 21, 52,5 %), suivi du groupe II (n = 16, 40 %) et du groupe I (n = 2, 5 %) ( $P < 0,0001$ ). Le CMV n'a en revanche pas été détecté dans cette étude.

Une méta-analyse (159) s'est penchée plus particulièrement sur la relation entre l'EBV et la parodontite ainsi que les paramètres cliniques dans l'objectif d'établir une clarification, du fait certaines controverses. 26 études ont été incluses, portant sur 1354 patients atteints de parodontite et 819 témoins sains. Même si les études incluses sont hétérogènes, nécessitant une certaine prudence dans l'interprétation des résultats, l'analyse a pu montrer qu'une fréquence élevée de détection de l'EBV est associée à un risque accru de parodontite.

L'association entre la co-infection herpétique/bactérienne et les maladies parodontales ont aussi été décrites, comme pour *Pg* et CMV ou Aa et HSV-1. Cependant, la manière dont les interactions entre les herpèsvirus et les bactéries parodontales influencent l'inflammation parodontale n'est toujours pas claire. Une étude *in vitro* (160) a ainsi souhaité étudier les effets de la co-infection avec certaines bactéries buccales sur les cellules épithéliales buccales infectées par le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1). Il est apparu que Aa a augmenté le rendement du HSV-1. La co-infection peut profiter soit au HSV-1 soit à Aa. Ces résultats font écho à des études cliniques antérieures montrant la co-infection du HSV et de Aa chez des patients atteints de parodontite agressive. Une autre étude avait pour objectif de clarifier l'association entre le CMV oral et la parodontite (161). Des échantillons de rinçage buccal ont été prélevés sur 190 patients afin d'y examiner la présence de l'ADN du CMV en utilisant la réaction en chaîne par réaction polymérase en temps réel (RT-PCR). *Pg* a été détecté par une analyse semi-quantitative par PCR. La co-infection par le CMV oral et *Pg* était significativement associée à la parodontite active. De plus, l'étude a montré que les interactions entre le CMV oral et *Pg* peuvent être liées à la sévérité de la maladie parodontale.

## 2. Herpès virus et maladie d'Alzheimer

De plus en plus de preuves confirment le lien entre les infections herpétiques et la MA. (18,162,163). Les herpès virus, notamment le HSV-1, ainsi que le VZV (164-167), ont été impliqués dans le développement de la MA, bien que ces relations restent controversées. L'infection par le VZV du SNC a déjà été associée à un déclin cognitif à long terme (168-169). Des données récentes suggèrent que le virus HZ ophtalmique et l'infection par le virus HZ sont associés à un risque 3,0 et 1,1 fois plus élevé de développement de la démence. (164,165,167). Cependant, et hormis quelques études (164,165,167, 170,171), le VZV n'a pas été suggéré jusqu'à présent comme une cause prospective de démence. Comme expliqué dans l'article de Itzhaki et al. 2021 (172), un argument possible contre son implication est le fait qu'il ne se réactive généralement qu'une fois, hors des réactivations récurrentes semblent être une condition préalable au développement de la démence, car la progression de la maladie se fait sur plusieurs années. Cependant, on ne sait pas si la démence peut être causée par le VZV s'il est présent dans le cerveau ou par une inflammation (réactivateur connu du HSV-1 latent) causée par une infection périphérique par le VZV entraînant une réactivation du HSV-1 dans le cerveau. Dans le cas des personnes souffrant de zona, Chen et al. (164) et Bae et al. (167) ont constaté que le zona était associé à un risque clair mais faible de MA/démence, et à un risque significativement plus faible chez les personnes traitées par des antiviraux. Il a en effet été suggéré par des études récentes (103,164,167) que le traitement antiviral (type acyclovir ou son pro-médicament le valacyclovir) serait associé à une diminution ultérieure de l'incidence de la MA chez les personnes infectées par l'herpès, ayant ainsi un effet protecteur.

Une étude a souhaité étudier une fois de plus cette relation (171). Elle a porté sur 265 172 sujets âgés de  $\geq 50$  ans, ayant reçu un diagnostic de VZV ou HSV, ou s'étant vu prescrire des médicaments antiviraux entre 2006 et 2017. Le traitement antiviral était associé à une diminution du risque de démence (rapport de risque ajusté [HR] 0,89, intervalle de confiance à 95 % [CI] 0,86 à 0,92), tandis que l'infection herpétique sans médicaments antiviraux augmentait le risque de démence (HR ajusté 1,50, CI à 95 % 1,29 à 1,74). Le traitement antiviral a été associé à un risque réduit de démence à long terme chez les personnes présentant des signes manifestes d'infection herpétique. Cette constatation est conforme aux résultats antérieurs indiquant que les HHV sont impliqués dans la pathogenèse de la MA. Cependant, ces observations ne permettent pas d'établir une relation de cause à effet entre l'herpès virus, le traitement antiviral et la démence. Cette étude confirme les résultats d'études précédentes quant à l'implication du VZV dans la MA (164,165 167,170) comme souligné dans l'article d'Itzhaki 2021 Vaccines (172).

De même, la question de l'effet de la vaccination contre le virus HZ reste débattue. Deux études récentes (173,174) se sont penchées sur cette question. Une première étude rétrospective (173) a souhaité déterminer si la vaccination contre l'herpès zoster, comparée à l'absence de vaccination contre le virus HZ, était associée à un risque plus faible de démence. Des données ont été obtenues à partir des dossiers médicaux des Veterans Health Affairs âgés de plus de 65 ans et exempts de démence pendant les deux

années précédant la période de référence. Selon les résultats de l'étude, la vaccination contre le virus HZ a ainsi été retrouvée associée à un risque réduit de démence. Les auteurs expliquent que la vaccination pourrait fournir une neuroprotection non spécifique en entraînant le système immunitaire à limiter l'inflammation dommageable, ou une neuroprotection spécifique qui empêche les effets cytopathiques viraux. Une seconde étude (174) a évalué la relation entre la vaccination contre le virus HZ et les troubles cognitifs. Pour cela, des données issues du Behavioral Risk Factor Surveillance System datant de 2017 ont été recueillies. Son constat concernant le fait que la vaccination contre le virus HZ réduit le risque de démence est cohérente avec le lien entre les virus et la MA. Cette étude pose ainsi l'hypothèse que la réactivation par les herpès virus de voies embryonnaires réduites au silence à la naissance pourrait être l'un des processus pathologiques de la MA.

Le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) est retrouvé fortement associé à la MA (18,162,163). De plus en plus de preuves, récentes et plutôt solides, associent HSV-1 avec un risque majeur de MA. Un article de revue récent (175) reprend ainsi dans un tableau quelques-unes des découvertes majeures récentes associant HSV-1 et MA entre 2005 et 2018:

Association of cognitive impairment with HSV1-seropositive APOE- $\epsilon$ 4 in aged cardiovascular patients → Strandberg et al. (2005) HSV1 load/expression is greater in APOE- $\epsilon$ 4 transgenic mice → Burgos et al. (2006), Miller and Federoff (2008), Bhattacharjee et al. (2008) Presence/levels of serum anti-HSV1 antibodies is associated with AD → Letenneur et al. (2008) and Lövheim et al. (2015) HSV1-infected cell cultures produce hyper- phosphorylated tau → Zambrano et al. (2008) Genetic links between HSV1 and host cells from GWAS → Licastro et al. (2011), Carter (2013) A $\beta$ inhibits HSV1 DNA replication in cultured neuronal cells → Bourgade et al. (2015) HSV1 causes synaptic dysfunction if cultured cortical neurons → Piacentini et al. (2015) Lysosomal load increases and lysosomal function impaired in HSV1-infected cell cultures → Kristen et al. (2018) HSV1-infection confers a risk of senile dementia and antiherpes antivirals strongly protect against SD → Tzeng et al. (2018) High levels of HHV6 and 7 in AD brains HSV1& also HSV1, and they cause changes in several transcriptional regulators → Readhead et al. (2018) A $\beta$ fibrillization occurs when A $\beta$ oligomer enfolds HSV1 as a protective measure → Eimer et al. (2018)
--

L'article (175) reprend les conclusions de deux articles récents impliquant HSV-1 et la MA. Les données sur la présence du HSV-1 dans une forte proportion de cerveaux de personnes âgées (176) et son association avec l'APOE- $\epsilon$ 4 chez les patients atteints de MA (177) soutiennent fortement un rôle causal du HSV-1 dans la MA, et soutiennent également la probabilité qu'un traitement antiherpétique puisse être utilisé pour prévenir l'apparition de la maladie ou pour ralentir sa progression.

Il est de plus à noter que l'interaction entre le CMV et HSV-1 serait de plus significativement associée au risque de développement de la MA (19).

HHV-6 est, comme HSV-1, un virus neurotrope fréquemment retrouvé au niveau cérébral. En effet, une augmentation de l'abondance de HSV-1 et HHV-6A/7 a été observée dans le cerveau de patients décédés et atteints de MA (101). Un autre article de revue récent du même auteur (172) reprend les preuves d'une possible implication du HHV-6 dans la MA. Une étude a ainsi montré que, chez les

patients atteints de MA, la fréquence de HHV-6 était élevée (70 %) chez les patients atteints de MA mais faible chez les témoins appariés (40 %), et que HHV-6 et HSV-1 étaient retrouvés dans 54 % des cerveaux des patients atteints de MA. Cependant, HSV-1 a aussi été retrouvé dans le cerveau d'une forte proportion de témoins âgés infectés mais asymptomatiques, ainsi que de patients atteints de la MA (178). La plupart des patients atteints de la MA, contre très peu de témoins âgés, étaient porteurs de l'allèle APOE-ε4. La présence du HSV-1 dans le cerveau et l'APOE-ε4 ont ainsi été proposés comme un facteur de risque majeur de la MA (177). le HHV-6 n'était pas directement associé aux patients atteints de la MA et porteurs de l'APOE-ε4. Ainsi, bien que le HHV-6 puisse être une infection opportuniste, il pourrait plutôt renforcer les dommages causés par le HSV-1 et l'APOE-ε4 dans la MA (179). L'article de revue cite une autre étude qui va dans le même sens (180), révélant des associations entre les niveaux de ces virus et les niveaux de diverses caractéristiques de la MA. Ces résultats ont toutefois été débattus puisqu' Allnut et al (181) ont réanalysé les données de Readhead et al et ont quant à eux constaté que la fréquence de détection de tout virus était extrêmement faible et ne différait pas de manière significative entre patients atteints de MA et patients non atteints. L'étude a conclu que HHV-6 n'était probablement pas impliqué dans la MA, certainement du fait que les témoins aussi peuvent être infectés. Chorlton (182) a également réanalysé les données et n'a détecté aucun HHV-7 et HHV-6A dans 13 % des échantillons qui avaient été signalés avec la plus grande abondance de HHV-6A. Ces nouvelles interprétations ne clarifient donc pas l'implication du HHV-6 dans la MA.

Si à l'heure actuelle, aucune recherche ne semble associer EBV à la MA, l'hypothèse selon laquelle une autre maladie inflammatoire chronique du système nerveux central, la sclérose en plaques (SEP), serait causée par une infection par l'EBV est depuis longtemps considérée comme un facteur déclenchant de la SEP (183) est mise en évidence par plusieurs études récentes. L'article (184) explique notamment que des analyses antérieures ont montré une augmentation des anticorps sériques contre l'EBV chez ~99,5 % des patients atteints de SEP par rapport à ~94 % des personnes en bonne santé (185)

Une étude (186) de cohorte a analysé les anticorps anti-EBV dans le sérum de 801 personnes ayant développé une SEP parmi une cohorte de plus de 10 millions de personnes actives dans l'armée américaine sur une période de 20 ans, montrant que le risque de SEP a été multiplié par 32 après une infection par l'EBV, mais n'a pas été augmenté après une infection par d'autres virus, y compris le CMV, qui se transmet de la même manière. Ces résultats ne peuvent être expliqués par aucun facteur de risque connu de la SEP et suggèrent de fait que l'EBV est la principale cause de la SEP.

Un autre étude récente (187) , cette fois in vitro, a permis d'identifier les miARN cibles de l'EBV et leurs gènes régulés, les gènes liés à la SEP ainsi que les voies de risque, ce qui pourrait fournir un nouvel aperçu de la découverte de biomarqueurs diagnostiques et de cibles thérapeutiques pour la SEP.

Une dernière étude (188) présente quant à elle des résultats plus mitigés concernant EBV puisqu'elle a montré, par des mesures sérologiques et de charge virale de base de l'exposition/réactivation à l'EBV et à l'HHV-6, une analyse des antécédents de mononucléose infectieuse, une évaluation annuelle de la

conversion à la SEP et des rechutes, qu'un taux élevé d'IgG HHV-6 était associé à un risque accru de conversion et de rechute de la SEP, mais avec des résultats à la limite de la significativité, et à une progression annualisée plus importante du handicap, tandis que l'association avec l'EBV était plus limitée.

Même si le sujet est soumis à controverses, de plus en plus de preuves tendent vers une association entre HHV et MA. La cavité buccale héberge en effet de nombreuses espèces virales neurotropes, dont on connaît pour certaines l'implication dans les gingivites ou les parodontites. Pour autant, la recherche semble actuellement peu concerner la sphère orale, or l'hypothèse d'une incursion cérébrale par des voies périphériques est souvent avancée.

## **PARTIE 5 : VERS UNE ASSOCIATION ENTRE VZV ET EBV et ALZHEIMER ? (ETUDE ORAMICAL)**

### **A. Etude de faisabilité**

#### **1. Collection d'échantillons (laboratoire MICORALIS)**

Une demande d'autorisation de réaliser une collection d'échantillons biologiques humains a été demandée par la Doctorante auprès de la Direction Générale de la Recherche et de l'innovation du Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation afin de réaliser des prélèvements. La Direction générale de la recherche et de l'innovation du Ministère de l'Enseignement supérieur de la Recherche et de l'Innovation a accusé réception du dossier le 06 avril 2021, enregistré sous le numéro DC-2021-4413). Compte tenu des délais légaux, la demande a été considérée comme acceptée le 07 mai 2021 (N° DC-2021-4413). L'étude a ensuite été enregistrée le 23 avril 2021 sous la référence 430 selon la méthodologie MR001(4) dans le registre d'activités de traitement des données du CHU de Nice (CHUN) comme une étude interne, ainsi aucune procédure supplémentaire n'a été nécessaire auprès de la CNIL. Un contrat de sous-traitance entre l'UCDA et le laboratoire MICORALIS a été mis en place pour le traitement des données par les personnels de l'UCDA.

Cette étude a été enregistrée auprès de ClinicalTrials.gov (numéro d'identification NCT04869904).

Enregistrée le 30 avril 2021,

[https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer+Disease&term=NCT04869904](https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer+Disease&term=NCT04869904&cntry=FR&state=&city=&dist=)

[4&cntry=FR&state=&city=&dist=](https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer+Disease&term=NCT04869904&cntry=FR&state=&city=&dist=)

#### **2. Protocole de recherche**

Une première phase de faisabilité a ainsi concerné 24 patients (13 cas et 11 témoins), recrutés lors d'une consultation gériatrique ou d'une consultation dentaire (Pôle Réhabilitation Autonomie, vieillissement et Pôle Odontologie, site de l'Hôpital de Cimiez, CHU de Nice) par la Doctorante. Tous les participants ou leurs représentants légaux, le cas échéant, ont donné leur consentement éclairé avant de participer à l'étude. (Le formulaire de consentement a réuni des informations suivantes : nom et affiliation de l'investigateur, explications concernant l'objectif facilement compréhensible par tous, déroulement et durée de l'étude, ainsi que la liberté de se retirer à tout moment, l'aval du comité d'éthique et la garantie de confidentialité.). Les différents formulaires d'information et de recueil du consentement éclairé sont consultables en annexes 1,2,3 et 4.

Cette étude a été conçue comme un préalable à une étude de plus grande envergure, et avait pour objectif de tester un protocole spécifique à petite échelle. Elle a ainsi permis d'établir des modifications et des ajustements en vue de la réalisation de l'étude ORAMICAL, en particulier concernant le protocole d'extraction d'ADN et l'identification et de profilage par qPCR classique.

L'étude, qui comprenait également un volet clinique, avec le recueil de données dentaires et parodontales, a ciblé 4 bactéries parodontales *Aa*, *Pg*, *An* et *Fn*, bactéries clés mises en évidence par notre revue de la littérature, ainsi que 7 parmi les 8 HHV (HSV-1, VZV, EBV, CMV, HHV-6A, HHV-7 et HHV-8).

Le protocole utilisé par la Doctorante pour l'extraction et la purification de l'ADN a ainsi été revu au fur et à mesure des manipulations et a été mis en œuvre selon le QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, Fifth Edition, May 2016, et effectué avec le kit Qiagen QIAamp DNA Mini Kit Protocol A-B (Gram-).

Une première étape a consisté en une extraction de l'ADN présent dans les prélèvements oraux, recueillis à l'aide de pointes papier n°25 ou n°30 (références A022T00002500 et A022T00003000; Dentsply Sirona) et placés dans des tubes de prélèvement Eppendorf® contenant 180 µl de Buffer ATL. Ainsi, après décongélation des prélèvements, ceux-ci ont été soniqués pendant 10 minutes, à température ambiante (Soniqueur Fisher Scientific FB15047) avant d'être vortexés pendant 15 secondes (Vortex VTX4000 VELP SCIENTIFICA). Les cônes de papier ont ensuite été retirés des échantillons. 20 µl de protéinase K, utilisée pour cliver les protéines contenues dans l'échantillon, et ainsi digérer les protéines contaminantes, dégrader les nucléases et protéger les acides nucléiques de l'attaque des nucléases, a ensuite été ajouté dans les tubes, qui ont à nouveau été vortexés pendant 15 secondes. Les prélèvements ont été incubés à 56°C (bain-marie SUB Aqua 2S Plus Grant), en vortexant toutes les 30 minutes, pour disperser l'ADN et ainsi augmenter l'activité enzymatique et donc l'efficacité de la protéinase K, puis brièvement (2 secondes) centrifugés (Centrifugeuse dominique Dutcher) afin de retirer les gouttes présentes à l'intérieur du couvercle. 200 µl de tampon chaotropique (Buffer AL) ont été ajoutés dans chaque prélèvement, avant de le pulse-vortexer pendant 15 secondes. Le Buffer AL est un détergent qui désorganise les membranes cellulaires et qui participe aussi à l'inactivation des nucléases.

Une phase d'incubation à 70°C a été respectée pour une durée de 10 minutes, puis les prélèvements ont été brièvement centrifugés. Enfin, 200 µl d'éthanol (96-100%) a été ajouté et les prélèvements ont une nouvelle fois été pulse-vortexés durant 15 secondes puis brièvement centrifugés.

L'éthanol précipite l'ADN dans l'échantillon afin de l'isoler.

La deuxième étape a consisté en une purification de l'ADN présent dans les prélèvements.

La préparation obtenue suite à l'étape précédente a été vidée dans une QIAamp Mini spin column. La purification de l'ADN se fait grâce à l'utilisation de deux phases non miscibles. Les acides nucléiques sont attirés par la phase aqueuse tandis que les protéines et les autres débris cellulaires seront isolés dans la phase hydrophobe. L'ADN est maintenu dans la colonne de silice (QIAamp Mini spin column) tandis que les contaminants sont évacués par des passages successifs de sels et d'alcool (Buffer AW1 et AW2)

Les colonnes ont ainsi été centrifugées à 8000 rpm pendant 1 minute (Centrifugeuse Centrifuge 5415 R Eppendorf). Chaque colonne a ensuite été placée dans un nouveau tube de 2 ml, et le tube contenant le filtrat a alors été jeté. 500 µl de Buffer AW1 a été ajouté dans le nouveau tube qui a ensuite été centrifugé



à 8000 rpm pendant 1 minute. Chaque colonne a une nouvelle fois été placée dans un nouveau tube de 2 ml, et le tube contenant le filtrat a été jeté. 500 µl de Buffer AW2 a été ajouté dans le nouveau tube qui a ensuite été centrifugé à 14000 rpm pendant 3 minutes. Afin de respecter un temps de séchage, chaque échantillon a été mis dans un « collection tube » de 2ml puis centrifugé à 14000 rpm pendant 2min.

La troisième étape a consisté en une élution de l'ADN présent dans les prélèvements.

La colonne a été placée dans un tube stérile de 1,5 ml (non fourni par le kit), et le tube contenant le filtrat a été jeté. 200 µl de Buffer AE a été ajouté afin d'éluder l'ADN contenu dans la colonne.

Une tentative de dilution avec 100 µl de Buffer AE a été effectuée lors de la troisième manipulation et a permis d'obtenir plus d'ADN. Elle a de ce fait été validée pour les extractions suivantes. Une dilution à 50 µl sera appliquée à de prochaines expérimentations. Les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 5 minutes puis centrifugés à 14000 rpm pendant 2 minutes.

La quatrième et dernière étape a été l'analyse de la qualité et la quantité de l'ADN présent dans les prélèvements.

Une quantité de 2 µl a été déposée sur un nanodrop spectrophotomètre (Nanodrop SimpliNano Biochrom), préalablement calibré 2 fois par l'analyse de Buffer AE.

Les tubes ont ensuite été conservés à -20°C en attendant les analyses par qPCR.

Le protocole de qPCR a également été revu au fur et à mesure des manipulations.

20 plaques Qiagen Qiagen® 96 puits ont été nécessaires pour conduire cette étude. Chaque puits permet de détecter la présence ou l'absence d'un gène (bactérie ou virus). Les 7 premières plaques ont été réalisées en duplicat (2 puits d'une plaque), puis les analyses des plaques restantes ont été effectuées en triplicat (3 puits d'une plaque) pour plus de reproductibilité des résultats.

Préalablement au remplissage de chaque plaque, un mélange réactionnel (mix) est à préparer selon un calcul standardisé. Il est composé de quantités variables d'eau stérile sans ARN/ADN, de SYBR Green (Colorant le plus couramment utilisé pour la détection non spécifique et ayant la capacité de se lier aux acides nucléiques et d'émettre une fluorescence. C'est une molécule pouvant se fixer sur tous les types d'acides nucléiques doubles brins. Une fois fixé, il devient un très bon fluorophore. Ainsi, le complexe ADN double brin/SYBR green absorbe la lumière bleue ( $\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$ ) et émet de la lumière verte ( $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$ ). La fluorescence émise peut être détectée et liée à la quantité de cible), et de Primer Forward et Reverse du gène bactérien ou viral à analyser. Les couples de primers utilisés pour amplifier sélectivement les séquences de ces 11 cibles microbiennes ont été définis et sélectionnés à partir d'articles publiés par d'autres équipes et validés en termes de spécificité et de sensibilité sur des cibles d'ADN purifiées au laboratoire MICORALIS avant la réalisation du projet.

Tous les échantillons ont été standardisés à une concentration de 10 ng/µl. Le calcul a été effectué en se basant sur la quantité d'ADN mesurée à la fin de la procédure d'extraction et de purification de l'ADN.

Chaque puits a ainsi été rempli avec 2 µl d'échantillon et 8 µl du mix dont les proportions ont été calculées de la façon suivante :

**Tableau 7 :** Calcul du volume de mix à préparer pour une analyse par qPCR classique en duplicat

	Mix SYBR® 1X	Mix SYBR®
SYBR®	5 µL	= 5*(XX*2(duplicat))+2(marge d'erreur))
H <sub>2</sub> O	2 µL	= 2*(XX*2+2)
Primer Forward	0,5 µL	= 0,5*(XX*2+2)
Primer Reverse	0,5 µL	= 0,5*(XX*2+2)
<b>TOTAL</b>	<b>8 µL</b>	

Avec XX = nombre d'échantillons à tester

**Tableau 8 :** Calcul du volume de mix à préparer pour une analyse par qPCR classique en triplicat

	Mix SYBR® 1X	Mix SYBR®
SYBR®	5 µL	= 5*(XX*3(triplicat))+3(marge d'erreur))
H <sub>2</sub> O	2 µL	= 2*(XX*2+2)
Primer Forward	0,5 µL	= 0,5*(XX*2+2)
Primer Reverse	0,5 µL	= 0,5*(XX*2+2)
<b>TOTAL</b>	<b>8 µL</b>	

Avec XX = nombre d'échantillons à tester

Une fois le remplissage d'une plaque terminé, celle-ci fut recouverte d'un film transparent puis brièvement centrifugée et placée sur l'automate (QuantStudio 5, Thermo Fisher). L'organisation de chaque plaque a été préalablement définie à l'aide du logiciel « Design and analysis 2.6.0 » (Thermo Fischer) puis enregistrée sur clé USB. Les données ont été transférées depuis la clef USB vers l'automate de qPCR afin que les échantillons soient ensuite analysés par celui-ci.

Le protocole de recherche utilisé ainsi que les résultats obtenus sont détaillés dans l'article 2 :

**Periodontal microbiota in elderly people diagnosed with Alzheimer's disease : a case-control study.**

3. Résultats

Cette étude de faisabilité a permis d'obtenir de premiers résultats significatifs. L'indice de plaque était significativement plus important chez les patients atteints de MA que chez les témoins, et leur niveau de dépendance était également significativement plus important. Cette étude met en évidence la présence marquée de certaines espèces bactériennes et virales dans les lésions parodontales des patients atteints de MA. Les différences (Fisher exact test) concernent VZV, EBV, *Pg* et *Fn* qui sont détectés de manière très significative chez les cas. Bien que basée sur un nombre de modeste de participants, cette étude met en évidence pour la première fois l'incidence accrue du VZV au niveau oral, associé à des marqueurs plus consensuels des dysbioses parodontales comme EBV, *Pg* et *Fn*.

**Contexte :** La maladie d'Alzheimer (MA) est la principale cause de déficience neurocognitive dans la population adulte. Des preuves scientifiques récentes montrent une association significative entre les maladies parodontales et la MA. Une explication possible de ce lien est que des agents infectieux ou inflammatoires peuvent se propager de la cavité buccale au cerveau.

**Objectifs :** L'objectif principal de l'étude ORAMICAL est de montrer la présence d'un ensemble d'espèces bactériennes et virales au niveau parodontal chez des personnes âgées de plus de 70 ans, diagnostiquées ou non avec la MA, afin d'établir une signature parodontale potentiellement associée à la MA.

**Méthodes :** Une première phase de faisabilité a concerné 13 cas et 11 témoins recrutés au CHUN. Le protocole comprenait l'analyse par qPCR d'échantillons de plaque subgingivale ainsi que la collecte de données cliniques dentaires, telles que le coefficient masticatoire, la présence de mobilité, l'indice de carie ou la mesure de l'état parodontal.

**Résultats :** Cette étude montre la présence marquée de certaines espèces bactériennes et virales dans les lésions parodontales des patients atteints de la MA. Des différences ont été trouvées pour le virus Varicella-Zoster (VZV) ( $p=0.023$ ), le virus Epstein-Barr (EBV) ( $p=0.032$ ), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) ( $p=0.023$ ) et dans une moindre mesure *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) ( $p=0.082$ ), qui ont été détectés plus fréquemment dans les cas .

**Conclusions :** Même si elle repose sur un nombre modeste de participants, cette étude met en évidence, pour la première fois, l'incidence accrue du VZV au niveau buccal, associée à des marqueurs plus consensuels de dysbiose parodontale comme EBV, *Pg* et *Fn*. Ces données restent à confirmer dans un échantillon de population plus large. S'il s'avère que les marqueurs oraux sont prédictifs du développement ou de la progression de la MA, le diagnostic et le suivi des personnes âgées pourraient être considérablement améliorés.

**Article 2. Résultats de l'étude pilote**

***Periodontal microbiota in elderly people diagnosed with  
Alzheimer's disease : a case-control study***

## **Presence of periodontal pathogens in elderly people diagnosed with Alzheimer's disease: a case-control study**

**Leslie Borsa<sup>1,2,3</sup>, Morgane Ortis<sup>1</sup>, Margaux Dubois<sup>1,2,3</sup>, Séverine Vincent-Bugnas<sup>1,2,3</sup>, Marlène Chevalier<sup>1</sup>, Lilit Tonoyan<sup>1</sup>, Laurence Lupi<sup>1,2,3</sup>, Guillaume Sacco<sup>4,5,6</sup> and Alain Doglio<sup>1,7</sup>**

<sup>1</sup>UPR7354- Micoralis, Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Université Côte d'Azur, 06300 Nice, France

<sup>2</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Université Côte d'Azur, 06300 Nice, France

<sup>3</sup>Pôle Odontologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Université Côte d'Azur, 06000 Nice, France

<sup>4</sup>Clinique Gériatrique du Cerveau et du Mouvement, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Université Côte d'Azur, 06003 Nice, France

<sup>5</sup>Université Côte d'Azur, CoBTeK, 06100 Nice, France

<sup>6</sup>Univ Angers, Université de Nantes, LPPL, SFR CONFLUENCES, 49000 Angers, France

<sup>7</sup>Unité de Thérapie Cellulaire et Génique (UTCG), Centre Hospitalier Universitaire de Nice, 06101, Nice, France

## **SUMMARY**

Recent evidence shows a significant association between periodontal disease and Alzheimer's disease (AD). A possible explanation could involve the spread of periodontal pathogens from the oral cavity to the brain. This pilot study aims to compare the presence of a set of periodontal microbial species in 2 age-paired groups of elderly people diagnosed (n=13) or not (n=11) with AD. The protocol included oral status determination and subgingival plaque sampling for the qPCR analysis of 7 Human Herpes Viruses (HHVs) and 4 common periodontal bacteria. Dental examination confirmed lower level of oral health in AD-patients regarding masticatory coefficient, presence of mobility, and caries index. Moreover, significant higher presence of Varicella-Zoster virus (VZV) (p=0.023), Epstein-Barr virus (EBV) (p=0.032), *Pg* (p=0.023) and to a lesser extent *Fn* (p=0.082) was reported in the group of AD-participants. This study highlights, for the first time, the increased incidence of VZV at the periodontal level, associated with more common periodontitis-associated pathogens, like EBV, *Pg* and *Fn*. Although, these data remain to be confirmed in a larger population sample, they open the way for a better understanding of AD-pathogenesis, and relationship with oral microbiology.

**Keywords:** Alzheimer's disease (AD) - periodontitis - oral microbiota - herpes virus (HHV) - - *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) - *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*)

## INTRODUCTION

The incidence of Alzheimer's disease (AD), the leading cause of neurocognitive disorders in the adult population, is increasing worldwide (1,2). To date, and despite the numerous in-depth studies performed over the last 30 years in understanding the neuropathological mechanisms, the question of the aetiopathogeny and of the various risk factors of AD remains widely debated (3,4). Recent studies have provided growing evidence that among the neuronal inflammation may have an infectious origin (5,6). Concurrently, significant links between periodontal diseases and AD have also been documented suggesting that the gingival inflammatory condition and AD may share some common risk factors (7-13). The oral cavity harbours a large and diverse microbiota that constitutes a permanent inflammatory reservoir related to oral pathogenesis and also to the systemic dissemination of pathogens from the mouth to distant sites. Strikingly, recent studies provided evidence that some oral pathogens may as well also participate in pathogenesis of neurodegenerative diseases (14-17). Growing evidence have documented the significant incidence of periodontal pathogenic bacteria like *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), *Campylobacter rectus* (*Cr*), *Pg* and *Actinomyces naeslundii* (*An*) in AD patients (13). Particularly, the anaerobic gram negative *Pg*, which is widely recognized as a key pathogen in periodontal diseases (18,19), is detected in the brain of AD patients (20,21) and these patients have significant higher blood levels of anti-*Pg* IgGs (22,23). In addition, *Pg* infection in mice models provided evidence of bacterial brain colonisation and increased amyloid plaque production and detrimental effects on tau functioning associated with the production of gingipain, a toxic protease released by *Pg* (20). In addition to periodontopathic bacteria, many studies have also pointed towards the link between oral diseases, periodontitis and the common presence of viruses from the human herpes viruses group (HHVs). Among oral HHVs, infections with Epstein-Barr viruses (EBV), Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and cytomegalovirus (CMV) have been closely related to oral inflammatory condition and notably periodontitis (24,25). Our team showed that EBV actively replicates in the periodontal lesions (26,27) with a significant increase with periodontitis severity. Concurrently, recent studies provided evidence for the involvement of HHVs in neurodegenerative disease. Infection with EBV dramatically increased the odds of developing multiple sclerosis (28). Moreover, neurotropic herpes viruses, such as HSV-1 and HHV-6A/7 have been commonly detected in the brains of deceased AD patients (15). In addition, aggressive antiviral treatment against HHV has been clearly associated with a decrease in the incidence of AD (29). The ORAMICAL study "Oral Microbiology in Alzheimer's patients" is an innovative case-control pilot aiming to study, at the periodontal level the presence of a selected set of bacterial and viral species in people diagnosed, or not, with AD. The primary objective was to identify periodontal species, combining viruses and bacteria, that would be significantly associated with AD. The secondary objectives were to compare oral hygiene and oral health in each group of participants.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Trial design and Ethical considerations**

ORAMICAL "Oral Microbiology in Alzheimer's patients" is a case-control study designed as a pilot study. This study was conducted at the CHU of Nice in people aged 70 years and older, with (cases) or without (controls) AD. The protocol is in accordance with the Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT) (30). The STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) guidelines (31) were followed (**Supplementary Material S1**).

The protocol and design of ORAMICAL were approved by the ethical and regulatory authorities and were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The ethics committee "Protection of Individual board of Ile de France V" (France) approved the protocol on 4 August 2021 (national registration number 2021-A01501-40). This study has been registered on ClinicalTrials.gov (identification number NCT04869904).

### **Setting and participants**

13 subjects aged over 70 years (cases) were recruited from an initial group of volunteers during an orientation visit (visit n°1) on a dental consultation or on a geriatric consultation for memory disorders within the Rehabilitation Autonomy Aging (RAV) pole of the University Hospital Centre (CHU) of Nice. All were diagnosed by an expert center as having a major or minor neurocognitive disorder (DSM-V,32) linked to probable or possible AD (DSM-V) and for which some participants benefited from the performance of biomarkers by CSF puncture at a certified laboratory (33), allowing a diagnosis of AD according to the NIA-AA criteria (34).

11 subjects aged over 70 years (controls) were also recruited from an initial group of volunteers during a dental consultation or following a geriatric consultation for falls within the Rehabilitation Autonomy Old Age (RAV) unit of the University Hospital Centre (CHU) in Nice. Controls were age-paired with cases and recruited because they had no AD-related symptoms and in particular no memory complaints. The iso-resource group (GIR) corresponding to the level of loss of autonomy of an elderly person, calculated from the assessment carried out using the national Autonomy, Gerontology, Iso-Resource Groups (AGGIR) grid (35) was also collected. It represents the standard assessment in France. The GIR varies from 1 to 6, with a GIR 1 corresponding to the highest level of loss of autonomy and a GIR 6 to the lowest level of loss of autonomy. All potential participants and/or their legal representatives, if any, were given an explanatory document about the study. The persons who agreed to participate and/or their legal representatives were informed orally and in writing about the modalities of their participation and about the course of the study. The participant or his/her legal representative accepted the conditions of the study and signed the informed consent form.

A medical questionnaire was proposed by the geriatrician or the dentist during the orientation visit to all



cases and controls recruited.

Individual inclusion and exclusion criteria are detailed in **Supplementary material S2**.

An history of oral surgery within the two months prior to sampling, of treatment with oral retinoids, bisphosphonates, oral anticoagulants or anticonvulsants, and of antibiotic, anti-inflammatory or mouthwash treatment within the last 4 weeks were also requested.

### **Oral examination**

During the inclusion visit (visit n°2), a dental examination was carried out for each participant with adapted dental instruments by a trained and calibrated dentist. All dental information and examination results were recorded on a standardized form.

Oral status was assessed by the following parameters: (i) presence and level of adaptation of dentures (binary evaluation presence vs. absence), (ii) geriatric masticatory coefficient (36) (score that can vary from 0 to 100%), (iii) number of caries (if present) by the DMFT index (Decayed, Missing or Filled Teeth) (37) (index applying to permanent teeth that can vary from 0 to 28). In addition, the Plaque Index (PI) (score ranging from 0 to 3) (38), the Bleeding on Probing (BoP) (39) (binary assessment presence vs. absence) and the presence of calculus (binary assessment presence vs. absence), as well as its abundance, were recorded as indicators of periodontal disease.

### **Periodontal microbiota sampling**

All participants were then subjected to subgingival plaque sampling. The intrasulcular sample was taken with a sterile paper point (paper point n°25 or n°30 ; Dentsply Sirona) left in place for 30 seconds. The samples were placed in sterile tubes, frozen and immediately stored at -20°C for further processing. The samples were taken from the upper right 1st molar or, if absent, the upper left 1st molar or the nearest upper right molar or the nearest upper left molar, or the lower right 1st molar or the lower left 1st molar or the nearest lower right molar or the nearest lower left molar. All samples were collected in the early afternoon. Participants had not eaten for at least two hours, and had not performed any mouthwash, mouth cleaning or chewed gum.

### **Microbiological analysis**

All samples were processed in a blinded fashion. Periodontal DNA was extracted from paper points with the Qiagen QIAamp DNA Mini Kit Protocol A-B (Gram-) following the manufacturer's instructions (Qiagen, Venlo, The Netherlands), with modifications. Eluted DNAs were stored at -20°C until further analysis. The DNA concentration and purity (A260/A280 and A260/A230 ratios) were determined using a SimpliNano spectrophotometer (Biochrom).

The detection of a total of 11 pathogens was performed by real-time qPCR. The targeted pathogens

included 7 HHVs: the Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1 or HHV-1), VZV (varicella zoster virus or HHV-3), Epstein Barr virus (EBV, or HHV-4) ; Cytomegalovirus (CMV or HHV-5), HHV-6A, HHV-7, HHV-8 (or Kaposi's virus) and 4 periodontopathogenic bacteria (*Actinomyces naeslundii* (*An*), *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)). List of primers pairs used for each pathogen is presented in the **Supplementary Material S3**. Extracted DNA was then subjected to amplification using the QuantStudio 5 Real-Time PCR System and Analysis Software 2.6.0 version (Thermo Fisher Scientific, Biosystems). Reactions were performed in a 25  $\mu$ L final volume using the PowerSYBR Green PCR Master Mix reagents (Thermo Fisher Scientific, Warrington, UK). Amplification conditions were as follows; 20 ng of diluted DNA and 2 $\mu$ M of each primer, and 95°C for 15 seconds plus 60°C for 1 minute cycled 40 times. Each sample was run in triplicate in each at least twice independent PCR analysis. The specificity and the sensitivity of each PCR-based pathogen detection were checked using a calibration range made either with plasmid DNAs containing the specific target sequences for each HHV or with purified bacterial genomes (not presented). Semi quantitative determination of the amount of microbial DNA detected in each sample was evaluated based on real time PCR cycle threshold (Ct) values and scored as follows(arbitrary unit) : score = 0, negative sample with Cts over the threshold value (Cts > 35) ; score = 1, weak presence (Cts of 30-35); score = 2, moderate presence (Ct of 32-35); score = 3, high presence (Cts of 25-30) and score = 4, strong positive reactions indicative of abundant presence of the microbial DNA (Ct < 25).

### Statistical methods

The analysis of the primary endpoint was performed by comparing the presence of the different viral and bacterial species in subgingival sample between cases and controls both, binary (present/absent), and using a semi-quantitative analysis representative of the amount of microbial genomes detected in periodontal sites of each participant. The secondary endpoints were analyzed by comparing clinical parameters such as oral status and especially periodontal status. The clinical and sociological characteristics of the participants were also analysed. We used Fisher's exact test for qualitative variables and Student's t-test or Mann-Whitney test for quantitative parameters, after performing a Shapiro-Wilk test to test the normality of data. P-values  $\leq 0.05$  were considered significant (marked with \*), and p-values < 0.01 were considered highly significant (marked with \*\*).

## RESULTS

### Clinical and sociological characteristics

The clinical and sociological characteristics (age, gender, GIR) of the cases and controls are presented in **Table 1**. Seventy-nine % of the participants were women and the mean age of the subjects was 85.85  $\pm$  7.2 years for the case group and 80.00  $\pm$  8.2 years for the control group, with no significant age difference between the groups (p=0.24). The subjects in the case group had a significantly higher level

of dependence than the controls ( $p=2.10^{-6}$ ).

**Table 1:** Clinical and sociological characteristics of cases (AD) and controls

	<i>AD</i> ( <i>n=13</i> )	<i>Controls</i> ( <i>n=11</i> )	<i>p-t value</i> <sup>a</sup>
<b>Gender</b>			
<i>Male, n (%)</i>	0 (0)	5 (45.5)	
<i>Female, n (%)</i>	13 (100)	6 (54.5)	<b>0,01*</b>
<b>GIR</b>	1.92	5.36	<b>2.10<sup>-6</sup>**</b>
<b>Age</b>	85.85 ± 7.2 y o	80.00 ± 8.2 y o	0.45

<sup>a</sup> *p-values were determined using Fisher's exact test for the qualitative variables (gender and GIR) and using a Student's t-test for the quantitative parameters (age).*

#### **Oral health and dental characteristics**

The dental characteristics of cases and controls are presented in **Table 2**. The Fisher exact test revealed significant differences between the two groups regarding microbial and inflammatory periodontal condition, the plaque index was significantly higher in AD participants ( $p=0.0046$ ) as compared with non-AD subjects. Similarly, the bleeding on probing (BoP) index was significantly higher in AD participants ( $p=0.034$ ). These results thus strongly suggested higher level of periodontal inflammatory condition associated with microbial overgrowth in AD participants. Concurrently no significant differences were found regarding other qualitative oral parameters, as the presence of removable prosthesis ( $p=0.3$ ) and presence of calculus ( $p=0.41$ ).

For the quantitative dental variables, i.e. masticatory coefficient and DMFT, were analyzed with a Student's t-test. The analysis revealed significant differences between the means of DMFT score ( $p=0.07$ ) and masticatory coefficient ( $p<0.0001$ ) in the 2 groups.

**Table 2:** Dental characteristics of cases (AD) and controls

	<i>AD</i> ( <i>n</i> =13)	<i>Controls</i> ( <i>n</i> =11)	<i>p-value</i> <sup>a</sup>
<b><i>Presence of dentures</i></b> ( <i>yes vs no</i> )	1 (7.7%)	3 (27.3%)	0.3
<b><i>Plaque Index</i></b> ( <i>PI</i> ) (0 to 3)	2.31	1.36	<b>0.0046**</b>
<b><i>Calculus</i></b> ( <i>not - a few - many</i> )	13 (100%)	2 (18.2%)	0.41
<b><i>Bleeding on Probing (BoP)</i></b> ( <i>yes vs no</i> )	13 (100%)	5 (45.5%)	<b>0.034*</b>
<b><i>DMFT</i></b> (0 to 28)	14.23± 6.57	6.73 ± 5.71	<b>0.013*</b>
<b><i>Masticatory Coefficient (CM)</i></b> (0 to 100%)	0,25 ± 0,31	0,74 ± 0,25	<b>0.001**</b>

<sup>a</sup>*p-values were determined using Fisher's exact test for the qualitative variables (Presence of dentures, PI, calculus, BoP) and using a Mann-Whitney test for the quantitative parameters (DMFT, CM).*

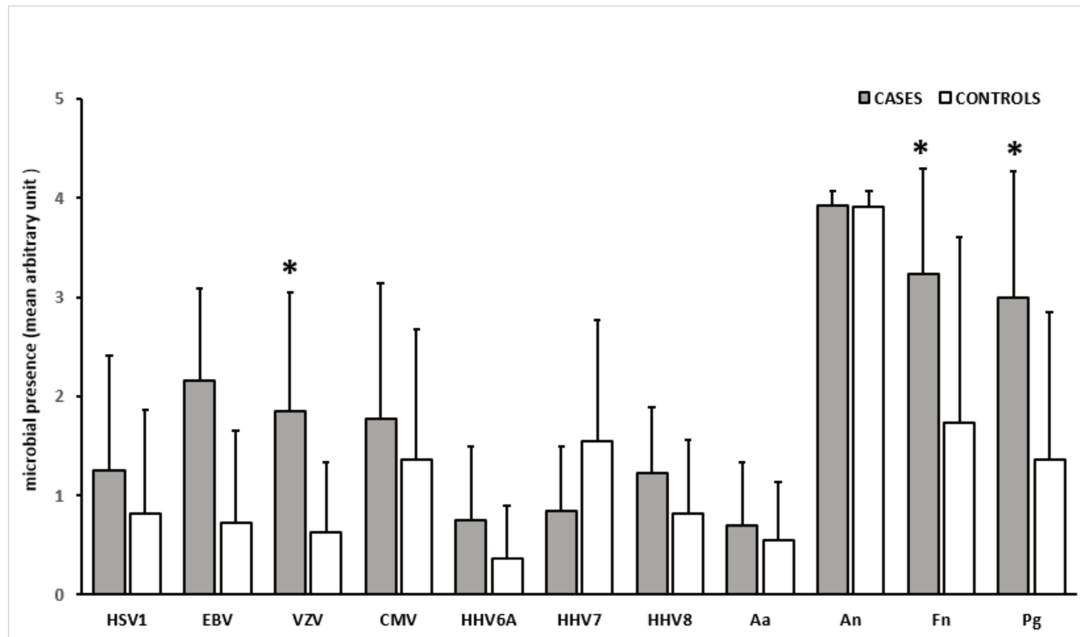
### Microbial characteristics

As explained in the Material and Methods paragraph, specimens were scored from 0 to 4 according to semi-quantitative interpretation of the PCR data (Ct values), to facilitate the interpretation of the raw data, detailed in **Supplementary Material S4**.

**Figure 1** presents the synthesis of the results obtained with the Real-time PCR analysis of the presence of 7 HHVs (HSV-1 to HHV-8) and 4 bacterial species (*Aa*, *An*, *Fn*, *Pg*) in periodontal sites of AD patients (cases, *n*=13) and controls (*n*=11) based on the classification of the data according to the attribution scale presented above. Each histogram represents the mean of the assigned values for each microorganism detected in the case group (*n*=13) and in the control group (*n*=11). EBV (*p*=0.012) and VZV (*p*=0.017) were significantly higher in AD patients compared to controls (Table 3, Figure 1). Bacteriologically, *Pg* was more frequently found in AD patients (*p*=0.032). *An* was abundant in both groups of subjects, which is explained by the fact that this bacterium is part of the healthy subgingival biofilm, but also pathogenic in periodontal disease (**Table 3, Figure 1**).

Apart from HHV-7, AD patients have on average higher viral and bacterial loads compared to control patients, although these differences are not statistically significant.

A hierarchical ascending classification was performed to group the participants according to their similarities based solely on the analysis of microbiological variables (**Figure 2**). With the exception of patient number 12, the participants with the most similarities were those in the same group (cases or controls). The dendrogram groups AD patients together and controls together. Thus, there is a typical microbiological signature of the person with AD (**Figure 2**).



**Figure 1:** Averages of different microorganisms loads in patients with Alzheimer's disease and controls, by category analysis

\*p<0.005

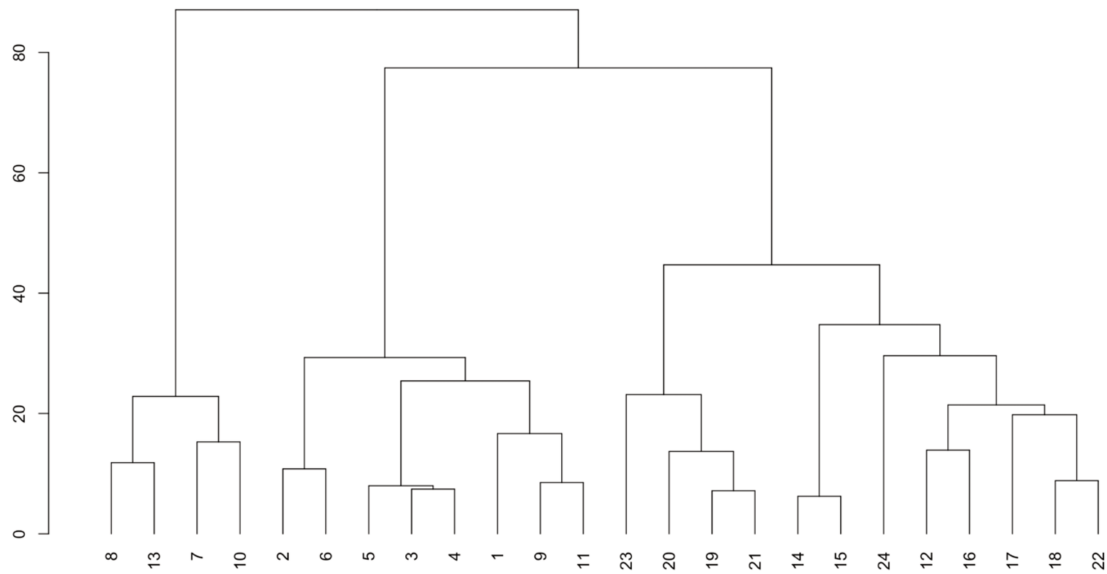
Histograms represent the mean of scores given to each specimen. Student's t-test or Mann-Whitney test were performed to test the statistical significance of the comparative analysis between cases and controls. The periodontal microbiota of patients with AD is characterised by a statistically significant increase in EBV, VZV and *Pg*.

**Tableau 3 :** Probability value (p-value) of bacterial and viral loads in cases and controls according to category analysis

<i>Microbial species</i> <i>Cases vs controls</i>	<i>p-value<sup>a</sup></i>	<i>Microbial species</i> <i>Cases vs controls</i>	<i>p-value<sup>a</sup></i>
HSV-1	0.393	<i>Aa</i>	0.781
<b>EBV</b>	<b>0.012*</b>	<i>An</i>	0.951
<b>VZV</b>	<b>0.017*</b>	<i>Fn</i>	0.094
CMV	0.402	<b><i>Pg</i></b>	<b>0.032*</b>
HHV-6A	0.343		
HHV-7	0.224		
HHV-8	0.230		

<sup>a</sup> p-values from Mann-Whitney test or Student's t-test to compare presence or absence of microbial genome in cases and controls

In the Mann-Whitney test, the H0 hypothesis is: the average viral/bacterial load is similar in both groups. A p-value of less than 0.05 rejects the H0 hypothesis and therefore indicates the presence of a statistically significant difference.



**Figure 2 :** Hierarchical ascending classification of the cohort

Patients 1-13 belong to the case group and patients 14-24 belong to the control group (age-matched healthy). The dendrogram groups the patients according to the analysis of their similarities from the Ct of the different microorganisms. It can be seen that the clustering corresponds to the two groups already established (cases and controls).

The comparative analysis of the amount of the microbial genomes detected in samples was in agreement with the binary analysis (**Table 4**) that showed that the 2 groups showed significant differences. VZV was significantly more present in AD patients ( $p=0.015$ ), as EBV ( $p=0.019$ ) and *Pg* ( $p=0.020$ ). No significant difference was observed for the other species.

**Table 4:** Probability value (p-value) of binary analysis for HHVs and bacterial in cases and controls

<i>Microbial species</i> <i>Cases vs controls</i>	<i>p-value</i> <sup>a</sup>	<i>Microbial species</i> <i>Cases vs controls</i>	<i>p-value</i> <sup>a,b</sup>
HSV-1	0.32	<i>Aa</i>	0.71
<b>EBV</b>	<b>0.019*</b>	<i>An</i>	NR
<b>VZV</b>	<b>0.015*</b>	<i>Fn</i>	0.12
CMV	0.12	<b><i>Pg</i></b>	<b>0.020*</b>
HHV-6A	0.29		
HHV-7	0.94		
HHV-8	0.12		

<sup>a</sup> *p-values from Fisher's exact test to compare presence or absence of microbial genome in cases and controls*

<sup>b</sup> *NR: not relevant*

## DISCUSSION

This case-control study examined the relationship between AD and the periodontal microbiota in people aged over 70 years. While approximately 700 different species of microorganisms live symbiotically in the oral cavity [12], we were particularly interested in the periodontal microbiota because the periodontal

inflammatory state, and in particular periodontitis, has been closely associated with AD. Indeed, several periodontal pathogens are suspected to play an etiological role in the genesis and aggravation of neurodegenerative diseases, including AD, suggesting an infectious and inflammatory connection between the oropharyngeal sphere and the brain (9,15,40-42). In this context, we show for the first time that there are significant differences in the periodontal presence of certain viral and bacterial species in AD patients compared to individuals of the same age without AD symptoms. For bacteria, periodontal *Pg* and *Fn* were found to be significantly associated with AD.

These data are consistent with a recent systematic review article (13) that describes an increase in *Fn* in AD patients and an incidence related to *Cr*, *Pg* and *An*, suggesting an association between these periodontal bacteria and AD. In addition, studies have shown the presence of periodontal bacteria in the brains of patients who died of AD. This is the case for *Pg* and *Fn*. Indeed, to date, the oral bacteria most frequently found in the CNS and associated with cognitive impairment are Spirochetes such as Treponemes or *Borrelia burgdorferi* (42), *Pg* (40,42), *Fn* and *Prevotella intermedia* (40). Not only has *Pg*, the key pathogen of chronic periodontitis, been significantly identified in the brain and cerebrospinal fluid of deceased AD patients in humans (43,44), but the biological plausibility is reinforced by laboratory studies showing that infection in mice leads to brain colonisation and increased production of amyloid plaques (20).

Growing evidences, including recent studies, supports the involvement of different HHVs in AD and other neurological diseases (5,45-48). In particular, the involvement of neurotropic herpes viruses, with increased abundance of HSV-1 and HHV-6A/7, has been suggested after the detection of these viruses in the brains of patients who died of AD (15).

Our results show that EBV was significantly more present in AD patients than in controls ( $p=0.032$ ). VZV was also found more frequently in AD patients ( $p=0.023$ ) and when it was found, it was found in greater quantity ( $p=0.0012$ ). This trend was also found to a lesser extent for EBV ( $p=0.086$ ), CMV ( $p=0.088$ ) and HHV-7 ( $p=0.06$ ), although these results are borderline significant. The oral cavity is a preferred site for the spread of most HHVs (HSV-1, CMV, EBV, HHV- 6, -7 and -8). These viruses are also known to be involved in the oral inflammatory state, particularly in the aggravation of periodontitis (49). EBV and CMV are among the herpes viruses consistently associated with periodontitis in the literature (39,48,49,24,25,49-51). Viruses such as HSV-1, VZV and EBV have also been cited as risk factors for non-plaque induced gingivitis (44).

Although no research currently appears to link EBV to AD, EBV has long been considered a trigger for another chronic CNS inflammatory disease, multiple sclerosis (MS) (16). In particular, a large cohort study (52) showed an increase in serum antibodies to EBV in ~99.5% of MS patients compared to ~94% of healthy individuals (53).

Of specific interest, our results show a significant increase in periodontal VZV in AD patients. Little is known about the presence of VZV in periodontal sites and previous studies have not found a significant association between VZV and periodontitis. However, VZV is thought to cause oral complications and

may contribute to necrosis of the periodontium and mandibular bone (54). In 2010, a paper reported the first case of pathological fracture of the mandible after VZV infection involving the mandibular division of the trigeminal nerve (55), demonstrating post-herpetic complications of osteonecrosis, spontaneous exfoliation of teeth and subsequent pathological fracture of the mandible in the absence of predisposing factors in a 65-year-old man. Bone involvement and spontaneous tooth exfoliation in zoster infection of the fifth cranial nerve are fortunately quite rare (56). A more recent paper (57) highlighted the distinctive features of a gingival infection secondary to varicella in a 58-year-old woman.

VZV (58-61) has been implicated in the development of AD, although this relationship remains controversial. VZV infection of the CNS has previously been associated with long-term cognitive decline (62,63). However, apart from a few studies (58,59,61,62,64,65), VZV has not so far been suggested as a prospective cause of dementia. A possible argument against its involvement is that it usually reactivates only once, although recurrent reactivations appear to be a prerequisite for the development of dementia, as disease progression occurs over several years (66). The average age of the participants was  $83.16 \pm 8.09$  years. The mean age of the cases was slightly higher, but this difference was not statistically significant ( $p=0.24$ ).

The gender of the participants was also not significant. Statistical calculations showed that women were more affected by AD than men ( $p=0.01$ ), but the majority of the subjects included in the study were women, which makes this value questionable. The case group was composed exclusively of women, whereas the control group was more homogeneous with 45.5% men. These data are consistent with the fact that women are more exposed to AD than men, particularly because they live longer (67), but also because they are more exposed to depression, a risk factor for AD (68). The GIR was significantly higher among the cases. The ageing of the population is an increasingly important issue, and many models exist in different countries to quantify the loss of autonomy. In France, the degree of dependence is defined by a medico-social team or the attending physician on the basis of the AGGIR grid, which establishes 6 levels of dependence. These levels are used in particular to define the financial benefit to be paid to the beneficiary concerned.

Statistically significant differences could be observed in the dental and periodontal indices recorded. The tests revealed a significantly higher plaque index ( $p=0.0046$ ), bleeding on probing index ( $p=0.034$ ) and DMFT score ( $p=0.07$ ) in AD patients. The oral health status of the cases thus appears to be worse, with the presence of AD representing a pejorative factor for oral disease.

While advancing age can generally explain deficiencies in oral hygiene practice, in our study the age difference between cases and controls was not significant ( $p=0.24$ ). The majority of AD patients had a high level of dependency and were institutionalised, and could not perform themselves the hygiene procedures. One might therefore expect that oral hygiene would be better performed by the carers than by the patient, but carers often do not pay the necessary attention to maintaining effective oral hygiene procedures (69,70). Caregivers in nursing homes and hospitals should therefore be better informed about



how best to meet these hygiene requirements. Indeed, oral health education for care home staff has been shown to improve their attitudes and knowledge of oral health care (71) and to reduce the level of plaque and associated gingival and mucosal infections in clients (72). In addition, it should be remembered that the link between poor oral hygiene and worsening general health conditions in the elderly has been demonstrated and highlighted by numerous studies (73-77). The fact that the controls had a higher masticatory coefficient ( $p < 0.0001$ ) is in agreement with the previous data, since these patients are better able to maintain their oral hygiene and thus keep their teeth in their mouths. The presence of tartar was not significantly higher in cases than in controls ( $p = 0.41$ ), which could be explained by the fact that many elderly patients do not consult a dentist, often for economic reasons. In France, the standard of living is lower at older ages, and the poverty rate is higher at age 80 (9.7%) than between 70 and 79 (between 7.0% and 7.3%). This reflects the relatively more unfavourable situation of people aged 80 or more living outside institutions: 55% have a standard of living below the median, compared with 45% for people aged 70 to 79 (78). AD patients were less likely to have dentures than controls, not because of a lack of clinical indication, but because this type of care is difficult to provide in patients with AD. The difference between the two groups was not significant ( $p = 0.3$ ).

Although this is a pilot study and to our knowledge no similar study has yet been proposed, several limitations must be taken into account.

Firstly, the lack of significance of some of the results could be partly explained by the lack of power due to the sample size. A study conducted on a larger number of participants could indeed lead to more significant results, which is why this first phase is a prerequisite for a larger study. In addition, the diagnosis of AD was made according to current guidelines, but without the possibility of post-mortem confirmation. Finally, the AD patients represented a very old and dependent population, which made it difficult to collect dental and periodontal clinical data.

## CONCLUSIONS

This feasibility study has produced significant initial results. The oral status appeared significantly worse for the cases. The plaque index was significantly higher in AD participants than in controls, and their level of dependency was also significantly higher. This study highlights the marked presence of certain bacterial and viral species in the periodontal lesions of AD participants. The differences (Fisher exact test) were for VZV, EBV, *Pg* and *Fn* which were detected to a high degree of significance in the cases. Although based on a still small number of participants, this study highlights for the first time the increased incidence of VZV at the periodontal level, associated with more consensual markers of periodontal dysbiosis like EBV, *Pg* and *Fn*. Further studies involving a large cohorts of AD patients and controls would clarify the role of these periodontal pathogens as risk factors for AD and allow for improved prevention and treatment of AD.

**Supplementary Materials:** S1: SPIRIT Checklist of the ORAMICAL study – S2: Individual inclusion and exclusion criteria for the participants of the ORAMICAL study – S3: List of primers pairs used pour each pathogen - S4: Microbiological characteristics of cases and controls

**Author Contributions:** Conceptualization, L.L. and A.D.; methodology, L.B., S.V.B., G.S., M.C.; formal analysis, L.B., M.C., L.T and M.O.; validation, L.B., G.S., L.L. and A.D.; writing—original draft preparation, L.B.; writing—review and editing, L.B., L.L. and A.D.; supervision, A.D. and L.L.; funding acquisition, L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

**Funding:** This research was funded by the Délégation à la Recherche Clinique et à l’Innovation of University Hospital of Nice (Centre Hospitalier Universitaire de Nice, public sector, 2021). The project was selected following an internal call for projects, grant number 21-AOI-05.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of “Protection of Individual board of Ile de France V” (France) (National registration number 2021-A01501-40, August 4, 2021).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data made non-nominative are kept for a period of 20 years in a secure cabinet in the Micoralis laboratory, Université Côte d'Azur, France.

**Acknowledgments:** We thank the pôle RAV of the Centre Hospitalier Universitaire de Nice.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends.
2. Mura T, Dartigues JF, Berr C. How many dementia cases in France and Europe? Alternative projections and scenarios 2010-2050. *Eur J Neurol.* 2010 Feb;17(2):252-9. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02783.x. Epub 2009 Oct 1. PMID: 19796284; PMCID: PMC2925047.
3. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789. PMID: 33302541; PMCID: PMC7764106.
4. Armstrong R. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2019;57(2):87-105. doi: 10.5114/fn.2019.85929. PMID: 31556570.
5. Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, Ball MJ, Bearer EL, Braak H, Bullido MJ, Carter C, Clerici M, Cosby SL, Del Tredici K, Field H, Fulop T, Grassi C, Griffin WS, Haas J, Hudson AP, Kamer AR, Kell DB, Licastro F, Letenneur L, Lövheim H, Mancuso R, Miklossy J, Otth C, Palamara AT, Perry G, Preston C, Pretorius E, Strandberg T, Tabet N, Taylor-Robinson SD, Whittum-Hudson JA. Microbes and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2016;51(4):979-84. doi: 10.3233/JAD-160152. PMID: 26967229; PMCID: PMC5457904.
6. Miklossy J. & McGeer PL. Common mechanisms involved in Alzheimer's disease and type 2 diabetes: a key role of chronic bacterial infection and inflammation. *Aging (Albany NY)* 8, 575–588 (2016).
7. Ranjan R, Abhinay A, Mishra M. Can oral microbial infections be a risk factor for neurodegeneration? A review of the literature. *Neurol India.* 2018 Mar-Apr;66(2):344-351. doi: 10.4103/0028-3886.227315. PMID: 29547153.
8. Dioguardi M, Gioia GD, Caloro GA, Capocasale G, Zhurakivska K, Troiano G, Russo LL, Muzio LL. The Association between Tooth Loss and Alzheimer's Disease: a Systematic Review with Meta-Analysis of Case Control Studies. *Dent J (Basel).* 2019 May 1;7(2):49. doi: 10.3390/dj7020049. PMID: 31052367; PMCID: PMC6630622.
9. Dioguardi M, Crincoli V, Laino L, Alovise M, Sovereto D, Mastrangelo F, Russo LL, Muzio LL. The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2020 Feb 11;9(2):495. doi: 10.3390/jcm9020495. PMID: 32054121; PMCID: PMC7074205.
10. Ashraf GM, Tarasov VV, Makhmutova A, Chubarev VN, Avila-Rodriguez M, Bachurin SO, Aliev G. The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease. *Mol Neurobiol.* 2019 Jun;56(6):4479-4491. doi: 10.1007/s12035-018-1388-y. Epub 2018 Oct 18. PMID: 30338482.
11. Olsen I, Singhrao SK. Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? *J Oral Microbiol.* 2015 Sep 17;7:29143. doi: 10.3402/jom.v7.29143. PMID: 26385886; PMCID: PMC4575419.
12. Pritchard AB, Crean S, Olsen I, Singhrao SK. Periodontitis, Microbiomes and their Role in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2017 Oct 24;9:336. doi:10.3389/fnagi.2017.00336. PMID: 29114218; PMCID: PMC5660720.
13. Borsa L, Dubois M, Sacco G, Lupi L. Analysis the Link between Periodontal Diseases and Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Sep 3;18(17):9312. doi: 10.3390/ijerph18179312. PMID: 34501899; PMCID: PMC8430572.

14. Lövheim H, Olsson J, Weidung B, Johansson A, Eriksson S, Hallmans G, Elgh F. Interaction between Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Type 1 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease Development. *J Alzheimers Dis.* 2018;61(3):939-945. Doi: 10.3233/JAD-161305. PMID: 29254081.
15. Hogestyn JM, Mock DJ, Mayer-Proschel M. Contributions of neurotropic human herpesviruses herpes simplex virus 1 and human herpesvirus 6 to neurodegenerative disease pathology. *Neural Regen Res.* 2018 Feb;13(2):211-221. doi: 10.4103/1673-5374.226380. PMID: 29557362; PMCID: PMC5879884.
16. Bar-Or A, Pender MP, Khanna R, Steinman L, Hartung HP, Maniar T, Croze E, Aftab BT, Giovannoni G, Joshi MA. Epstein-Barr Virus in Multiple Sclerosis: Theory and Emerging Immunotherapies: (Trends in Molecular Medicine, 26:3 p:296-310, 2020). *Trends Mol Med.* 2021 Apr;27(4):410-411. doi: 10.1016/j.molmed.2021.01.004. Epub 2021 Feb 17. Erratum for: *Trends Mol Med.* 2020 Mar;26(3):296-310. PMID: 33608230; PMCID: PMC8445335.
17. Robinson WH, Steinman L. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Science.* 2022 Jan 21;375(6578):264-265. doi: 10.1126/science.abm7930. Epub 2022 Jan 13. PMID: 35025606..
18. Socransky SS, Haffajee AD, et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):134-44.
19. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38:135-87.
20. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U, Raha D, Griffin C, Holsinger LJ, Arastu-Kapur S, Kaba S, Lee A, Ryder MI, Potempa B, Mydel P, Hellvard A, Adamowicz K, Hasturk H, Walker GD, Reynolds EC, Faull RLM, Curtis MA, Dragunow M, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* 2019 Jan 23;5(1):eaau3333. doi: 10.1126/sciadv.aau3333. PMID: 30746447; PMCID: PMC6357742.
21. Poole S, and al. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-terms postmortem's Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis.* 2013; 36(4):655-77.
22. Stewart R, Sabbah W, Tsakos G, D'Aiuto F, Watt RG. Oral health and cognitive function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Psychosom Med.* 2008 Oct;70(8):936-41. doi: 10.1097/PSY.0b013e3181870aec. Epub 2008 Oct 8. PMID: 18842752.
23. Chen CK, Wu YT, Chang YC. Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study. *Alzheimers Res Ther.* 2017 Aug 8;9(1):56. doi: 10.1186/s13195-017-0282-6. PMID: 28784164; PMCID: PMC5547465.
24. Slots J. (2010). Human viruses in periodontitis. *Periodontology 2000*, 53, 89–110. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00325.x>
25. Slots J. (2015). Periodontal herpesviruses: prevalence, pathogenicity, systemic risk. *Periodontology 2000*, 69(1), 28–45. <https://doi.org/10.1111/prd.12085>
26. Olivieri, C. V., Raybaud, H., Tonoyan, L., Abid, S., Marsault, R., Chevalier, M., Doglio, A., & Vincent-Bugnas, S. (2020). Epstein-Barr virus-infected plasma cells in periodontitis lesions. *Microbial pathogenesis*, 143, 104128. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104128>
27. Vincent-Bugnas, S., Vitale, S., Mouline, C. C., Khaali, W., Charbit, Y., Mahler, P., Prêcheur, I., Hofman, P., Maryanski, J. L., & Doglio, A. (2013). EBV infection is common in gingival epithelial cells of the periodontium and worsens during chronic periodontitis. *PloS one*, 8(12), e80336.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080336>

28. Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6578), 296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
29. Tzeng NS, Chung CH, Lin FH, Chiang CP, Yeh CB, Huang SY, Lu RB, Chang HA, Kao YC, Yeh HW, Chiang WS, Chou YC, Tsao CH, Wu YF, Chien WC. Anti-herpetic Medications and Reduced Risk of Dementia in Patients with Herpes Simplex Virus Infections-a Nationwide, Population-Based Cohort Study in Taiwan. *Neurotherapeutics*. 2018 Apr;15(2):417-429. doi: 10.1007/s13311-018-0611-x. PMID: 29488144; PMCID: PMC5935641.
30. Chan AW, Tetzlaff JM, Gøtzsche PC, Altman DG, Mann H, Berlin JA, Dickersin K, Hróbjartsson A, Schulz KF, Parulekar WR, Krleza-Jeric K, Laupacis A, Moher D. SPIRIT 2013 explanation and elaboration: guidance for protocols of clinical trials. *BMJ*. 2013 Jan 8;346:e7586. doi: 10.1136/bmj.e7586. PMID: 23303884; PMCID: PMC3541470.
31. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP; STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg*. 2014 Dec;12(12):1495-9. doi: 10.1016/j.ijsu.2014.07.013. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25046131.
32. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*, 5<sup>th</sup> ed.; American Psychiatric Publishing: Arlington, VA, 2013; pp. 5-25.
33. The Alzheimer's Association QC program for CSF and blood biomarkers, the Clinical Neurochemistry Laboratory in Gothenburg, Sweden in conjunction with the Alzheimer's Association, 2009
34. Jack, C. R., Jr, Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., Sperling, R., ... Contributors (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 14(4), 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
35. Grille nationale AGGIR et son guide de remplissage, Code de l'action sociale et des familles, Annexe 2-1, version en vigueur depuis le 11 mai 2017
36. Berard, A. (Victor Segalen University, Bordeaux 2, Bordeaux, France); Poisson, P. (Victor Segalen University, Bordeaux 2, Bordeaux, France); Bourdel-Marchasson, I. (Bordeaux University, Bordeaux, France); Dupuis, V. (Bordeaux University, Bordeaux, France). Removable prosthesis improves body mass index in elderly people. September. Poster presentation at the IADR/PER General Session (London), 2018.
37. Klein, H.; Palmer, C.E. Studies on dental caries: X. a procedure for the recording and statistical processing of dental examination findings. *J Dent Res*. 1940, 19(3): 243-56.
38. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975 Dec;25(4):229-35. PMID: 1058834.
39. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol*. 1972 Jan;43(1):38. doi: 10.1902/jop.1972.43.1.38. PMID: 4500182.

40. Sparks Stein P, Steffen MJ, Smith C, Jicha G, Ebersole JL, Abner E, Dawson D 3rd. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012 May;8(3):196-203. doi: 10.1016/j.jalz.2011.04.006. PMID: 22546352; PMCID: PMC3712346.
41. Lövheim H, Olsson J, Weidung B, Johansson A, Eriksson S, Hallmans G, Elgh F. Interaction between Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Type 1 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease Development. *J Alzheimers Dis*. 2018;61(3):939-945. doi: 10.3233/JAD-161305. PMID: 29254081.
42. Miklossy J. Historic evidence to support a causal relationship between spirochetal infections and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2015 Apr 16;7:46. doi: 10.3389/fnagi.2015.00046. PMID: 25932012; PMCID: PMC4399390.
43. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontol Res*. 2000 Feb;35(1):3-16. doi: 10.1034/j.1600-0765.2000.035001003.x. PMID: 10791704.
44. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S28-S43. doi: 10.1111/jcpe.12938. PMID: 29926497.
45. Agostini S, Mancuso R, Costa AS, Citterio LA, Guerini FR, Meloni M, Navarro J, Clerici M. A Possible Role for HSV-1-Specific Humoral Response and *PILRA* rs1859788 Polymorphism in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jun 22;9(7):686. doi: 10.3390/vaccines9070686. PMID: 34206597; PMCID: PMC8310311.
46. Carbone I, Lazzarotto T, Ianni M, Porcellini E, Forti P, Masliah E, Gabrielli L, Licastro F. Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Jan;35(1):122-9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.024. Epub 2013 Aug 3. PMID: 23916950.
47. Harris SA, Harris EA. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;48(2):319-53. doi: 10.3233/JAD-142853. PMID: 26401998; PMCID: PMC4923765.
48. Steel AJ, Eslick GD. Herpes Viruses Increase the Risk of Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*. 2015;47(2):351-64. doi: 10.3233/JAD-140822. PMID: 26401558.
49. Abooj J, Varma SA. Prevalence of herpes virus in chronic periodontitis patients with and without type 2 diabetes mellitus: A clinico-microbiological study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2021 Jan-Apr;25(1):141-146. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_154\_20. Epub 2021 May 14. PMID: 34349425; PMCID: PMC8272489.
50. Maulani C, Auerkari EI, C Masulili SL, Soeroso Y, Djoko Santoso W, S Kusdhany L. Association between Epstein-Barr virus and periodontitis: A meta-analysis. *PLoS One*. 2021 Oct 7;16(10):e0258109. doi: 10.1371/journal.pone.0258109. PMID: 34618843; PMCID: PMC8496828.
51. Nakamura M, Shigeishi H, Cheng-Yih SU, Sugiyama M, Ohta K. Oral human cytomegalovirus prevalence and its relationships with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults: a cross-sectional study. *J Appl Oral Sci*. 2020 Dec 18;28:e20200501. doi: 10.1590/1678-7757-2020-00501. PMID: 33331391; PMCID: PMC7793530.
52. Robinson WH, Steinman L. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Science*. 2022 Jan 21;375(6578):264-265. doi: 10.1126/science.abm7930. Epub 2022 Jan 13. PMID: 35025606.
53. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007 Apr;61(4):288-99. doi: 10.1002/ana.21117. PMID: 17444504.
54. Rhissassi M, Benrachadi L, Benzarti N. Etiopathogénie des maladies parodontales. Quelle est la

place des virus ? *Rev Odont Stomat* 2004;33:275-283

55. Jain MK, Manjunath KS, Jagadish SN. Unusual oral complications of herpes zoster infection: report of a case and review of literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Nov;110(5):e37-41. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.04.026. Epub 2010 Aug 6. PMID: 20692192.

56. Wright WE, Davis ML, Geffen DB, Martin SE, Nelson MJ, Straus SE. Alveolar bone necrosis and tooth loss. A rare complication associated with herpes zoster infection of the fifth cranial nerve. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983 Jul;56(1):39-46. Doi: 10.1016/0030-4220(83)90053-1. PMID: 6576309.

57. Chopra A, Sivaraman K, Thomas BS. Herpes zoster of gingiva in an older woman: a rare case report. *Gerodontology.* 2017 Jun;34(2):280-283. doi: 10.1111/ger.12246. Epub 2016 Jul 19. PMID: 27435832.

58. Chen VC, Wu SI, Huang KY, Yang YH, Kuo TY, Liang HY, Huang KL, Gossop M. Herpes Zoster and Dementia: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *J Clin Psychiatry.* 2018 Jan/Feb;79(1):16m11312. doi: 10.4088/JCP.16m11312. PMID: 29244265.

59. Tsai MC, Cheng WL, Sheu JJ, Huang CC, Shia BC, Kao LT, Lin HC. Increased risk of dementia following herpes zoster ophthalmicus. *PLoS One.* 2017 Nov 22;12(11):e0188490. doi: 10.1371/journal.pone.0188490. PMID: 29166672; PMCID: PMC5699837.

60. Bubak AN, Como CN, Coughlan CM, Johnson NR, Hassell JE, Mescher T, Niemeyer CS, Mahalingam R, Cohrs RJ, Boyd TD, Potter H, Russ HA, Nagel MA. Varicella-Zoster Virus Infection of Primary Human Spinal Astrocytes Produces Intracellular Amylin, Amyloid- $\beta$ , and an Amyloidogenic Extracellular Environment. *J Infect Dis.* 2020 Mar 16;221(7):1088-1097. doi: 10.1093/infdis/jiz560. PMID: 31665341; PMCID: PMC7075411.

61. Bae S, Yun SC, Kim MC, Yoon W, Lim JS, Lee SO, Choi SH, Kim YS, Woo JH, Kim SY, Kim SH. Association of herpes zoster with dementia and effect of antiviral therapy on dementia: a population-based cohort study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2021 Aug;271(5):987-997. doi: 10.1007/s00406-020-01157-4. Epub 2020 Jul 1. PMID: 32613564.

62. Grahn A, Nilsson S, Nordlund A, Lindén T, Studahl M. Cognitive impairment 3 years after neurological Varicella-zoster virus infection: a long-term case control study. *J Neurol.* 2013 Nov;260(11):2761-9. doi: 10.1007/s00415-013-7057-1. Epub 2013 Jul 31. PMID: 23900759.

63. Persson A, Bergström T, Lindh M, Namvar L, Studahl M. Varicella-zoster virus CNS disease--viral load, clinical manifestations and sequels. *J Clin Virol.* 2009 Nov;46(3):249-53. doi: 10.1016/j.jcv.2009.07.014. Epub 2009 Aug 25. Erratum in: *J Clin Virol.* 2010 Feb;47(2):203. PMID: 19709927.

64. Schnier C, Duncan S, Wilkinson T, Mbizvo GK, Chin RFM. A nationwide, retrospective, data-linkage, cohort study of epilepsy and incident dementia. *Neurology.* 2020 Sep 22;95(12):e1686-e1693. doi: 10.1212/WNL.0000000000010358. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32680951.

65. Lopatko Lindman K, Hemmingsson ES, Weidung B, Brännström J, Josefsson M, Olsson J, Elgh F, Nordström P, Lövheim H. Herpesvirus infections, antiviral treatment, and the risk of dementia-a registry-based cohort study in Sweden. *Alzheimers Dement (N Y).* 2021 Feb 14;7(1):e12119. doi: 10.1002/trc2.12119. PMID: 33614892; PMCID: PMC7882534.

66. Itzhaki RF. Overwhelming Evidence for a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) in Alzheimer's Disease (AD); Underwhelming Evidence against. *Vaccines (Basel).* 2021 Jun 21;9(6):679. doi: 10.3390/vaccines9060679. PMID: 34205498; PMCID: PMC8234998.

67. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World

Population Prospects 2019 : Volume II : Demographic Profiles.

68. Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavedo, E., Chiesa, P. A., Schumacher Dimech, A., Santucciono Chadha, A., Baracchi, F., Girouard, H., Misoch, S., Giacobini, E., Depypere, H., Hampel, H., & Women's Brain Project and the Alzheimer Precision Medicine Initiative (2018). Sex differences in Alzheimer disease - the gateway to precision medicine. *Nature reviews. Neurology*, 14(8), 457–469. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0032-9>.
69. Tonsekar PP, Jiang SS, Yue G. Periodontal disease, tooth loss and dementia: Is there a link? A systematic review. *Gerodontology*. 2017 Jun;34(2):151-163. doi: 10.1111/ger.12261. Epub 2017 Feb 7. PMID: 28168759.
70. Noble JM, Scarmeas N, Papapanou PN. Poor oral health as a chronic, potentially modifiable dementia risk factor: review of the literature. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013 Oct;13(10):384. doi: 10.1007/s11910-013-0384-x. PMID: 23963608; PMCID: PMC6526728.
71. Frenkel H, Harvey I, Needs K. Oral health care education and its effect on caregivers' knowledge and attitudes: a randomised controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002 Apr;30(2):91-100. doi: 10.1034/j.1600-0528.2002.300202.x. PMID: 12000349.
72. Frenkel H, Harvey I, Newcombe RG. Improving oral health in institutionalised elderly people by educating caregivers: a randomised controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2001 Aug;29(4):289-97. doi: 10.1034/j.1600-0528.2001.290408.x. PMID: 11515643.
73. Aida J, Kondo K, Yamamoto T, Hirai H, Nakade M, Osaka K, Sheiham A, Tsakos G, Watt RG. Oral health and cancer, cardiovascular, and respiratory mortality of Japanese. *J Dent Res*. 2011 Sep;90(9):1129-35. doi: 10.1177/0022034511414423. Epub 2011 Jul 5. PMID: 21730255.
74. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci*. 2007;64(4):180-9. doi: 10.1080/09674845.2007.11732784. PMID: 18236742.
75. Hajishengallis G. Too old to fight? Aging and its toll on innate immunity. *Mol Oral Microbiol*. 2010 Feb;25(1):25-37. doi: 10.1111/j.2041-1014.2009.00562.x. PMID: 20305805; PMCID: PMC2839454.
76. Ortega O, Parra C, Zarcero S, Nart J, Sakwinska O, Clavé P. Oral health in older patients with oropharyngeal dysphagia. *Age Ageing*. 2014 Jan;43(1):132-7. doi: 10.1093/ageing/aft164. Epub 2013 Nov 4. PMID: 24190874.
77. Gil-Montoya JA, de Mello AL, Barrios R, Gonzalez-Moles MA, Bravo M. Oral health in the elderly patient and its impact on general well-being: a nonsystematic review. *Clin Interv Aging*. 2015 Feb 11;10:461-7. doi: 10.2147/CIA.S54630. PMID: 25709420; PMCID: PMC4334280.
78. Insee Références – Édition 2021 – Fiche 1.21 – Niveau de vie et pauvreté des personnes âgées



**Supplementary material S1 : SPIRIT 2013 Checklist for the ORAMICAL STUDY**

*Diagram of recommended content for the schedule of enrolment, interventions, and assessments for the present study, based on SPIRIT 2013 (18).*

	STUDY PERIOD			
	Enrolment	Inclusion	Post-inclusion	Close-out
TIMEPOINT	$-t_1$	0	$t_1$	$t_x$
<b>ENROLMENT:</b>				
Eligibility screen	X			
Informed consent		X		
Medical questionnaire	X	X		
Hygiene motivation		X		
<b>INTERVENTIONS:</b>				
Oral samples		X		
<b>ASSESSMENTS:</b>				
Baseline variable : Neuro-cognitive diagnosis	X			
Primary outcome variable: Quantification of periodontal bacterial and viral species from oral samples			X	
Secondary outcome variables: Dental check-up Recording of clinical evidence		X		
Close-out of the study				X

**Supplementary material S2:** Individual inclusion and exclusion criteria for the participants of the ORAMICAL study

	<b>CASE GROUP</b>	<b>CONTROL GROUP</b>
<b><i>Inclusion criteria</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) Age over 70 y.o</li> <li>(ii) Presence of AD according to the previously defined criteria</li> <li>(iii) The participant or his/her guardian, if applicable, accepted the terms and conditions of the study and signed the informed consent form</li> <li>(iv) At least one tooth present in the mouth</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) Age over 70 years</li> <li>(ii) Absence of AD according to the previously defined criteria</li> <li>(iii) The participant accepts the terms and conditions of the study and signs the informed consent form</li> <li>(iv) At least one tooth present in the mouth</li> </ul>
<b><i>Exclusion criteria</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) Presence of a neurodegenerative pathology (excluding AD for cases)</li> <li>(ii) Presence of a neurocognitive disorder (excluding AD for cases)</li> <li>(iii) Presence (current or past) of any type of cancer including oral or aerodigestive tract, the presence of viral diseases ( Human Immunodeficiency Virus (HIV) or hepatitis)</li> <li>(iv) Presence of chronic inflammatory diseases (such as rheumatoid arthritis (RA) or Gougerot-Sjogren's syndrome (GSS)</li> <li>(v) Presence of severe haemopathy</li> <li>(vi) Presence of acute or chronic cardiovascular, renal, hepatic, gastrointestinal disease</li> <li>(vii) Presence of acute or chronic severe cardiovascular, renal, hepatic, gastrointestinal, allergic, endocrine, pulmonary, or neuropsychiatric disease deemed by the investigator to be incompatible with the study as it may interfere with the results of the oral flora sampling</li> </ul>	

**Supplementary material S3: List of primers pairs used pour each pathogen**

<b>Primers Forward (F) and Reverse (R)</b>	<b>SEQUENCES</b>
<b>HSV1-F</b>	TGTTTCGCGATTGTCTCGGAA
<b>HSV1-R</b>	GAAAACCACCACCACGCAAC
<b>EBV-F</b>	TACAGGACCTGGAAATGGCC
<b>EBV-R</b>	TCTTTGAGGTCCACTGCCG
<b>VZV-F</b>	CGGGGAACGGTTAATGCAAC
<b>VZV-R</b>	CTTTGGCCTTGGGGTTTTGG
<b>CMV-F</b>	GTTTCATGGTTTCGCGCAGTA
<b>CMV-R</b>	GCTGCGTTTGGAAGAACTCA
<b>HHV6A-F</b>	GATGCCGTGTTGGCGGATTA
<b>HHV6A-R</b>	GGCAAAGCACACAGATCCAAG
<b>HHV7-F</b>	ATGTTGGATGAACGCGGATG
<b>HHV7-R</b>	AAATCACCCTTGCGTGCAG
<b>HHV8-F</b>	CATGTCACAAAACAGAAAGACTCTGCC
<b>HHV8-R</b>	GCATTCGGCGCCCCC
<b><i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>-F</b>	GAACCTTACCTACTCTTGACATCCGAA
<b><i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>-R</b>	TGCAGCACCTGTCTCAAAGC
<b><i>Porphyromonas gingivalis</i>-F</b>	GGAAGAGAAGACCGTAGCACAAGGA
<b><i>Porphyromonas gingivalis</i>-R</b>	GAGTAGGCGAAACGTCCATCAGGTC
<b><i>Fusobacterium nucleatum</i>-F</b>	GGATTTATTGGGCGTAAAGC
<b><i>Fusobacterium nucleatum</i>-R</b>	GGCATTTCCTACAAATATCTACGAA
<b><i>Actinomyces naeslundii</i>-F</b>	GGCTGCGATACCGTGAGG
<b><i>Actinomyces naeslundii</i>-R</b>	TCTGCGATTACTAGCGACTCC

Supplementary material S4: microbiological data of cases and controls

		HSV1	EBV	VZV	CMV	HHV6A	HHV7	HHV8	Aa	An	Fn	Pg
CASES	1	1	2	0	1	0	0	0	1	4	4	0
	2	3	0	1	0	2	1	1	0	4	4	4
	3	3	3	2	1	1	1	1	0	4	4	4
	4	3	4	1	1	1	1	1	0	4	4	3
	5	3	3	1	1	2	1	1	0	4	4	2
	6	NC	0	1	1	2	1	3	1	4	4	4
	7	0	2	4	4	0	0	1	1	4	3	3
	8	0	3	4	4	1	2	1	2	4	4	4
	9	1	3	1	1	0	0	0	0	3	0	NC
	10	0	2	3	4	0	0	1	0	4	0	3
	11	1	1	1	0	0	2	2	1	4	4	2
	12	0	2	1	1	NC	2	3	1	4	4	3
	13	0	3	4	4	0	0	1	2	4	3	4
Average		1.25	2.15	1.85	1.77	0.75	0.85	1.23	0.69	3.92	3.23	3.00
Standard deviation		1,17	0,93	1,20	1,37	0,75	0,65	0,66	0,64	0,14	1,07	1,27

	N°	HSV1	EBV	VZV	CMV	HHV6A	HHV7	HHV8	Aa	An	Fn	Pg
CONTROLS	1	4	0	2	2	1	3	2	1	4	4	0
	2	3	0	2	2	2	2	1	1	4	4	0
	3	0	2	0	0	0	0	0	1	4	0	2
	4	0	2	1	0	0	3	0	2	4	0	3
	5	1	3	0	0	0	3	1	0	4	4	0
	6	0	1	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	7	0	0	0	3	0	1	1	0	3	0	2
	8	0	0	1	3	0	0	0	0	4	0	0
	9	0	0	0	0	0	2	0	0	4	0	0
	10	0	0	1	4	0	0	1	1	4	3	4
	11	1	0	0	1	1	3	3	0	4	4	4
Average		0,82	0,73	0,64	1,36	0,36	1,55	0,82	0,55	3,91	1,73	1,36
Standard deviation		1,04	0,93	0,69	1,31	0,53	1,22	0,74	0,60	0,17	1,88	1,49

Ct	Categories
<25	4 Very strong
<30	3 Strong
<32	2 Moderate
<35	1 Low
>35	0 Absent
NC	Non conclusive

---

## Etude ORAMICAL

Afin de poursuivre nos recherches sur un plus grand échantillon de participants, une demande de financement a été déposée en janvier 2021 à un appel d'offre interne (AOI) du CHUN, elle a été retenue en avril 2021 pour un budget de 9895 € et va débuter en avril 2022. En ce sens, et en tant qu'investigateur principal du projet, j'ai effectué une formation à la recherche clinique en juin 2021. Le budget du projet figure en annexe 5.

Le protocole et la conception de l'étude ORAMICAL ont été approuvés par les autorités éthiques et réglementaires et ont été réalisés conformément à la Déclaration d'Helsinki. Le protocole de l'étude est détaillé dans l'article 3 : **Periodontal microbiota in elderly people diagnosed with Alzheimer's disease : a case-control study protocol (ORAMICAL: Oral Microbiology in Alzheimer's patients)** Dans le cadre de l'obtention de l'AOI, un CPP a été saisi le 28 mai 2021 et un premier retour a été obtenu le 6 juillet 2021. Le Conseil de la protection des personnes d'Ile de France a approuvé le protocole le 4 août 2021. (N° National 2021-A01501-40).

Cette étude a été enregistrée auprès de ClinicalTrials.gov (numéro d'identification NCT05077618).

**Contexte :** L'incidence de la maladie d'Alzheimer (MA) augmente dans le monde entier. Des preuves toujours plus importantes semblent indiquer un entre maladies parodontales et MA, étayant l'hypothèse selon laquelle le microbiote parodontal pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la MA. En particulier, certains agents pathogènes parodontaux majeurs peuvent être couramment détectés dans les lésions de la MA, suggérant une connexion infectieuse entre la sphère oro-pharyngée et le cerveau.

**Méthodes :** L'étude ORAMICAL "Oral Microbiology in Alzheimer's patients" est une étude cas-témoins non randomisée. Elle vise à étudier la présence d'un ensemble sélectionné d'espèces bactériennes et virales parodontales chez des personnes âgées de plus de 70 ans, atteintes ou non de la maladie d'Alzheimer. Trente-neuf cas et 39 témoins seront recrutés à la suite d'une consultation avec un gériatre au CHUN. Les échantillons parodontaux des patients seront collectés par un écouvillonnage oral réalisé sur la dent présentant la poche parodontale la plus profonde. Les ADN microbiens seront ensuite analysés par qPCR en temps réel et par qPCR multiplex microfluidique (Fluidigm Biomark HD System). Des données cliniques telles que le coefficient masticatoire, la présence de mobilité, le dommage carieux ou la mesure du dommage parodontal seront recueillies. Ce protocole d'étude est rapporté selon les Standard Protocol Items : Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT). Les directives de l'étude STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) seront suivies.

**Discussion :** L'objectif principal est d'établir une signature parodontale, associant virus et bactéries, qui serait significativement associée à la MA. Les résultats secondaires consistent à comparer l'hygiène et l'état bucco-dentaires dans chaque groupe de patients. Si les marqueurs bucco-dentaires s'avéraient être

prédictifs du développement ou de la progression de la MA, le diagnostic et le suivi des personnes âgées pourraient être facilités.

**Article 3. Protocole ORAMICAL**

***Periodontal microbiota in elderly people diagnosed with  
Alzheimer's disease : a case-control study protocol***

Protocol

# Periodontal microbiota in elderly people diagnosed with Alzheimer's disease: a case-control study protocol (ORAMICAL: Oral microbiology in Alzheimer's patients)

Leslie Borsa<sup>1,2,3,\*</sup>, Séverine Vincent-Bugnas<sup>2,3,4</sup>, Guillaume Sacco<sup>5,6,7</sup>, Florence Carrouel<sup>8</sup>, Marlène Chevalier<sup>3</sup>, Paul Tramini<sup>9</sup>, Laurence Lupi<sup>1,2,3</sup> and Alain Doglio<sup>3,10</sup>

<sup>1</sup> Université Côte d'Azur, Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Département de Santé Publique, 06353 Nice, France.

<sup>2</sup> Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle Odontologie, 06000 Nice, France.

<sup>3</sup> Université Côte d'Azur, Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, UPR7354 - Laboratoire Microbiologie orale, Immunothérapie et Santé (Micoralis), 06353 Nice, France ;

<sup>4</sup> Université Côte d'Azur, Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Département Parodontologie, 06353 Nice, France.

<sup>5</sup> Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Clinique Gériatrique du Cerveau et du Mouvement, 06003 Nice, France.

<sup>6</sup> Université Côte d'Azur, CoBTeK, 06100 Nice, France.

<sup>7</sup> Univ Angers, Université Nantes, LPPL, SFR CONFLUENCES, 49000 Angers, France

<sup>8</sup> Health, Systemic, Process, EA4129 Research Unit, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69372 Lyon, France.

<sup>9</sup> Université de Montpellier, Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Département de Santé Publique, Montpellier, France.

<sup>10</sup> Unité de Thérapie Cellulaire et Génique (UTCG), Centre Hospitalier Universitaire de Nice, 06101, Nice, France.

\* Correspondence: leslie.borsa@univ-cotedazur.fr

## Abstract:

**Background:** The incidence of Alzheimer's disease (AD) is increasing worldwide. Growing evidences show that periodontal diseases are related to AD. Some major periodontal pathogens can be detected in AD brain lesions, suggesting an infectious connection between the oro-pharyngeal sphere and the brain.

**Methods:** The ORAMICAL "Oral Microbiology in Alzheimer's patients" study is a non-randomized case-control study that aims to investigate the presence of a selected set of periodontal bacterial and viral species in people over 70 years old with, or without, AD. Thirty nine cases and 39 controls will be enrolled following a consultation with a geriatrician at the Nice University Hospital. Periodontal specimens will be collected and microbial DNAs will be analyzed by real-time qPCRs and microfluidic multiplex qPCRs. Blood levels of inflammatory markers will also be analyzed. Clinical data such as carious damage or measurement of periodontal damage will be collected.

**Conclusions:** The primary outcome is to establish a periodontal signature that would be significantly associated to AD. The secondary outcomes are to compare oral condition and blood levels of inflammatory markers in each group of patients. If oral markers were found to be predictive of the development or progression of AD, the diagnosis and follow-up of older people could be facilitated.

**Keywords:** Alzheimer's disease - periodontal disease - periodontitis - oral microbiota - *Porphyromonas gingivalis*

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Methods Protoc.* 2022, 5, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47



## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of neurocognitive impairment in the adult population [1]. The Global Burden of Disease Report considers the disability, in terms of decline in health related to cognitive impairment, to be the most important compared to all other conditions, except for severe neurodevelopmental disorders [2]. Nearly 47 million people worldwide are currently affected by AD. [1]. Despite the huge progresses made during the last 30 years in understanding the neuropathological mechanisms, [3], the question of the etiopathogeny and of the risk factors remains widely debated [4,5]. Recently, a link between periodontal disease (PD) and AD has been demonstrated [6-12]. PD is a chronic inflammatory disease related to dysbiosis of the gingival microbiota. PD is one of the most common inflammatory diseases, affecting about 50% of the world's population [13]. Severe forms, that affect nearly 10% of the world's population [14], have been shown to be the major cause of tooth loss [13]. Moreover, PD represents a key risk factor of systemic diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, rheumatoid arthritis, cancer, chronic obstructive pulmonary diseases, adverses pregnancy outcomes and AD [8,11,15-20]. The link between between PD and AD could be explained by the fact that some periodontal bacteria, and their bacterial toxins, could migrate from the oral cavity into various organs or tissues including the brain and induce neuronal inflammation [6,9-11]. Indeed, a recent work demonstrated the presence of oral pathogens in brain lesions of AD patients [21]. The most common oral bacteria found in the central nervous system and associated with cognitive impairment are Spirochetes, such as *Treponema* species or *Borrelia burgdorferi* [22], *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) [22,23], *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) and *Prevotella intermedia* (*Pi*) [23]. In addition, the human herpes viruses (HHVs), that are also commonly present in the oral cavity, have been shown to actively replicate in periodontal lesions and propose to play a major role in periodontitis [24,25,26]. Interestingly, some oral HHVs have also been associated with AD and others neurological diseases [27,28], notably an increase in Human herpes virus 6 (HHV-6) and Herpes simplex 1 (HSV-1) was demonstrated in the brain of AD patients [29].

It is therefore crucial to explore the periodontal microbiome to identify pathogens that may represent a risk for the development of AD. To date, few studies analyzed the oral microbiota in elderly AD patients [30-33]. In a case-control study, Liu et al. (2019) studied for the first time the salivary microbiome of AD patients [34]. It showed less diversity than that of the control group. No bacteria were identified as being associated with AD severity.

The purpose of the ORAMICAL study "Oral Microbiology in Alzheimer's patients" is to compare AD patients with the one of patients AD free. One specific question is addressed as follows according to the PICO principles: Are seniors over 70 years of age (Population) with AD (Intervention) compared with AD-free seniors (Control) carriers of specific periodontal bacteria and viruses (Outcome) in terms of quality or quantity in their periodontal microbiota ?

## 2. Methods

### 2.1. Trial design

This study protocol is reported according to the Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials (SPIRIT) guidelines [35] (Figure 1 and Supplementary material Table 1).

48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97

	STUDY PERIOD			
	Enrolment	Inclusion	Post-inclusion	Close-out
TIMEPOINT	- $t_1$	0	$t_1$	$t_x$
<b>ENROLMENT:</b>				
Eligibility screen	X			
Informed consent		X		
Medical questionnaire	X	X		
Hygiene motivation		X		
<b>INTERVENTIONS:</b>				
Oral samples		X		
Blood samples		X		
<b>ASSESSMENTS:</b>				
Baseline variable : Neuro-cognitive diagnosis	X			
Primary outcome variable: Quantification of periodontal bacterial and viral species from oral samples			X	
Secondary outcome variables: Dental check-up Recording of clinical evidence		X		
Secondary outcome variables: Blood levels of inflammatory markers			X	
Close-out of the study				X

98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145

146

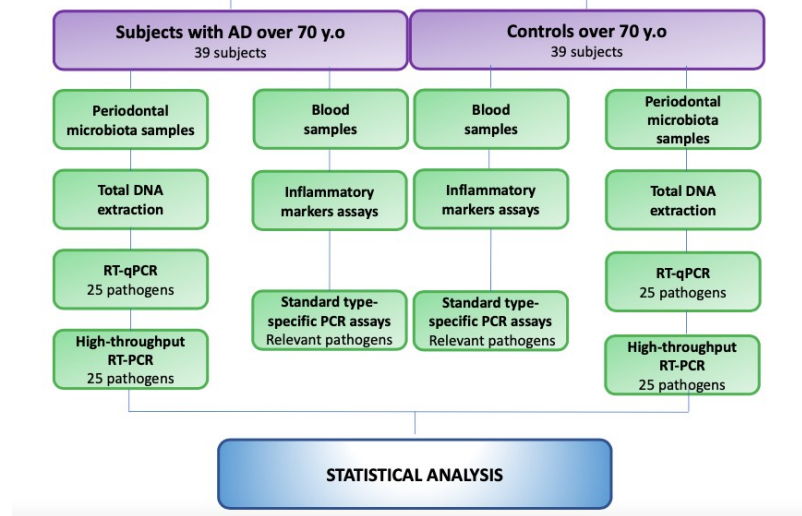
Figure 1. Diagram of recommended content for the schedule of enrolment, interventions, and assessments for the ORAMICAL study, based on SPIRIT 2013 [35].

147  
148

The ORAMICAL study is designed as a non-randomized case-control clinical study (Figure 2). This study will be carried out on people aged 70 and over, with (cases) or without (controls) AD.

It is registered in the database for registration of clinical studies (ClinicalTrials.gov, identification number NCT05077618).

The guidelines for case-control studies, set out in the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE), will be followed [36].



**Figure 2.** Workflow of the experiment; PCR: Polymerase Chain Reaction; RT: Real Time

2.2. Study settings

This study will be conducted at the Nice University Hospital, France, in the departments of geriatrics and odontology.

2.3. Study population

Seventy-eight subjects aged over 70 years (39 cases and 39 controls) will be recruited from an initial group of volunteers. The informed consent to participate will be given by the participant himself/herself or his/her guardian, if applicable.

Subjects will be enrolled in the study following a consultation with a geriatrician.

2.3.1. Eligibility criteria

The individual inclusion criteria for the “case” group will be (i) age 70 and over, (ii) major neurocognitive impairment in probable AD, established after lumbar puncture biomarker testing, and minor neurocognitive impairment in possible AD (without lumbar puncture biomarker testing), according to the criteria of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-V) [37], generally including different aspects such as a cognitive assessment (including a global evaluation, usually with the Mini Mental

151  
152  
153  
154  
155  
156

157

158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175

State Evaluation, MMSE), a functional assessment (Instrumental activities of daily living, IADL or activities of daily living, ADL scales), a behavioral assessment, a clinical examination, and para-clinical examinations.

In the case of a so-called possible diagnosis, or for ages over 80 years, biomarker testing is not indicated if the disorders are major/blatant, and characterization will also be performed using magnetic resonance imaging (MRI) [38], the diagnosis will be done by a geriatrician, and (iii) the participant or his/her guardian, if applicable, agrees to the terms and conditions of the study and signs the informed consent form.

The individual inclusion criteria will be for the control group (i) age 70 and over, (ii) senior AD-free, and (iii) the participant agrees to the terms and conditions of the study and signs the informed consent form.

The dental inclusion criteria will be (i) at least one tooth present in the mouth.

### 2.3.2. Exclusion criteria

The individual exclusion criteria will be (i) the presence of a neurodegenerative pathology (excluding AD for cases), (ii) the presence of a neurocognitive disorder (excluding AD for cases), (iii) the presence (current or past) of any kind of cancer, including oral or aerodigestive tract, (iv) the presence of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (RA) or Gougerot-Sjogren's syndrome (GSS), (v) viral diseases (AIDS, viral hepatitis), (vi) the presence of severe haemopathy, (vii) the presence of severe acute or chronic cardiovascular, renal, hepatic, gastrointestinal disease (viii) the presence of acute or chronic severe cardiovascular, renal, hepatic, gastrointestinal, allergic, endocrine, pulmonary or neuropsychiatric condition deemed by the investigator to be incompatible with the study as it may interfere with the results of the oral flora sampling, (viii) a history of oral surgery within the two months preceding the sampling

(ix) a history of treatment with oral retinoids, bisphosphonates, oral anticoagulants or anticonvulsants, (x) a history of antibiotic, anti-inflammatory or mouthwash treatment within the last 4 weeks.

### 2.4. Intervention

The ORAMICAL study is designed as a case-control study, no intervention will be applied to participants. The participants will be assigned to the case or the control group according to their AD status.

### 1.1. Outcomes

#### 1.1.1. Primary outcomes

The primary outcome will be to compare qualitatively and quantitatively periodontal bacterial and viral species present in the periodontal microbiota from 70 years old's people with and without AD in order to determine a periodontal microbiological signature specific to AD

#### 1.1.2. Secondary outcomes

The secondary outcomes will be to:

- 1/Compare the dental condition of patients with AD and control subjects.
- 2/Compare periodontal status of patients with AD and control subjects.
- 3/Compare the level of oral hygiene of patients with AD and control subjects.
- 4/Compare blood levels of inflammatory markers of patients with AD and control subjects.

5/Validate sequencing data by "specific type" quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR): The presence of oral pathogens identified by sequencing as potentially of interest

will be validated by classical specific type PCR analyses, retrospectively on the oral samples concerned, and also looked for in blood samples.

2.6. Participant timeline

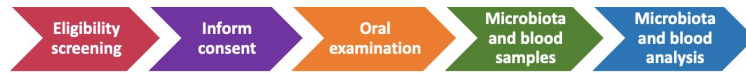


Figure 3. Chronology of the study

2.6.1. Recruitment

Participants will be recruited by a geriatrician. Given the number of patients received in dental and geriatric consultations, the inclusion period will last approximately for 36 months.

All potential participants, and/or their legal representatives, will receive an explanatory document about the study. If they wish, additional information can be provided to the referring practitioners on request. Those who agree to participate, and/or their legal representatives, will be orally informed and in writing about the modalities of their participation and the course of the study. A consultation visit to the dental chair of the Cimiez Hospital (Nice University geriatric hospital, France) will then be scheduled. During this visit, an oral examination will check the oral inclusion criteria, and microbiota samples will be collected.

2.6.2. Dental and periodontal examination

The dental examination will be carried out by a trained and calibrated dentist having a good knowledge of the clinical clues studied. The dentist will repeat with the patient the medical examination previously performed.

The oral condition will be assessed by the following parameters (i) presence and level of dental prostheses fitting (ii), geriatric masticatory coefficient [39], (iii) presence of tooth mobility and its gradation according to Muhlemann's classification [40], (iii) number of tooth decay (if present) by the DMFT index [41].

A charting of the clinical periodontal parameters will be performed including [42] periodontal pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing index (BOP) [43] and plaque index (PI) [44], on the tooth from which the microbiological sample is taken.

2.6.3. Samples

1. Microbiota samples

Sampling will be taken from the tooth showing the most severe pocket depth (PPD). In the case of similar pocket depths in the same mouth, the tooth sampled will be the right upper first molar or, in case of loss, the left upper first molar, or the nearest right upper molar, or the nearest left upper molar, or the right lower 1st molar, or the nearest left lower molar, or the nearest tooth. The tooth selected for sampling will be isolated with sterile dental swabs. Periodontal sampling will be taken with a sterile paper point (paper point n°25 or n°30 (blister of 5) ; product n° 289608, references A022T00002500 and A022T00003000 ; Dentsply Sirona) left in place 30 seconds and a dental plaque sample will be taken by scraping with a periodontal curette. The samples will be placed in sterile tubes, then frozen and stored at -20°C for further laboratory processing. All samples will be taken in the early afternoon. Participants will not have eaten for at least two hours, nor will they have performed mouthwash, oral cleaning or chewed gums.

226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273

## 2. Blood samples 274

A venous blood sampling for serological study and peripheral pathogen detection will be performed by a nurse from the geriatric department. 275  
276  
277

### 2.6.4. Analysis 278

All samples will be processed blind. 279  
280

#### 1. Microbiological analysis 281

Periodontal DNAs, mostly microbial genomes and residual human DNAs, will be exacted from oral swabs with the QIAamp DNA Mini Kit (protocol A-B (Gram-) following the manufacturer's instructions (Qiagen, Venlo, Netherlands) and collected in an elution volume of 100 µl (Buffer AE). Checking for DNA quality and quantities will be achieved through spectrophotometric analysis at 260 and 280 nm (nanodrop; Thermo Scientific NanoDrop 2000.) The eluted DNA will be kept stored at -20°C until further analysis. 282  
283  
284  
285  
286  
287  
288

Detection of periodontal pathogens will be carried out as follows. A total of 25 periodontal bacteria have been selected as representative of pathogenic and commensal periodontal flora, set of pathogenic species are *Eikenella corrodens* (Ec), *Prevotella melaninogenica* (*P.melaninogenica*), *Streptococcus mitis* (Sm), *Streptococcus oralis* (So), *Streptococcus sanguis* (Ss), and set of commensal bacteria are *Actinomyces naeslundii* (An), *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* (Cr), *Eubacterium nodatum* (En), *Fn*, *Peptostreptococcus micros* (*P.micros*), *Pg*, *Prevotella intermedia* (Pi), *Prevotella nigrescens* (Pn), *Tannerella forsythesis* (Tf), *T denticola* (Td). Concurrently, this study also focus on oral HHVs, and the 9 human HHVs will be investigated (i.e., HSV-1, or HHV-1 ; HSV-2, or HHV-2 ; varicella zoster virus (VZV), or HHV-3 ; Epstein Barr Virus (EBV), or HHV-4 ; Cytomegalovirus (CMV), or HHV- 5 ; HHV-6A ; HHV-6B ; HHV-7 and HHV-8 (or Kaposi virus). 289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299

Detection of these oral pathogens will be performed first using conventional real-time qPCR technology. Primer sets for each microbial target have been designed following recommendations in the literature. 300  
301  
302

2 µL of extracted DNA at a concentration of 10ng/µL and 8 µL of a mix composed of 5 µL of Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, California, USA), 2 µL of RNase-free water, 0.5 µL of forward primer and 0.5 µL of reverse primer of the tested gene will be added to the wells of a MicroAmp™ EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plate with Barcode (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). This will be performed in a Classic thermal cycler (QuantStudio 5, Thermo Fisher Scientific). PCR stage will be 40 cycles at (95°C during 15 seconds plus 60°C during 1 minute). 303  
304  
305  
306  
307  
308  
309

For high-throughput PCR amplification, we will use the IFC BioMark 48x192DA chip (Fluidigm). For each sample, we will prepare a 3 µL sample mix containing 1.5 µL of Sso- 311 Fast™ EvaGreen® Supermix with Low ROXTM (2X) (Bio-Rad PN 1772-5211), 0.15 µL of 310  
311  
312

20× sampleloading reagent (Fluidigm PN 100-7673) and 1.35 µL of pre-amplified sample (pre-amplified sample). Assay mixes will be prepared for each pair of primers (corresponding to the primer sequences of the selected bacterial and viral species), containing the 2X assay loading reagent (Fluidigm PN 100-5359) and primers at a final concentration of 5 µM). Prior to loading the sample and assay mixes, the (48.48DA) will be primed in the IFC controller MX (Fluidigm); 3 µL of sample mix and 3 µL of assay mix, for each of the samples and assays, will be dispensed into the sample and assay inlets, respectively, on the 48.48DA. The 48.48DA will be placed in the IFC controller MX for loading and mixed. After ~55 min, the 48.48DA will be ready for thermal cycling in the high-throughput rtPCR instrument (BioMark; Fluidigm) with the following cycling conditions: 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of 94°C for 15 s, and 60°C for 60s. The tests will be performed in duplicate, and the samples will be tested in single reactions. Three positive 313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324

controls, containing a mixture of all positive controls included in the screen, 2 non-tem- 325 plate  
controls (nuclease-free water; Amresco), a pre-amplification/cDNA non-template 326 control and  
a pre-amplification non-template control (nuclease-free water) will be in- 327 cluded in each IFC  
48,48DA chip along with the positive and negative extraction controls. 328 Data, including Ct  
values and amplification curves, will be acquired on the BioMark sys- 329 tem and analysed (real-  
time PCR analysis software v.4.1.3; Fluidigm). The amplification 330 efficiency will be calculated  
for each rtPCR assay based on the slope of the standard curve, 331 as previously described [45].

## 2. Blood analysis 332

All blood samples will be centrifuged and aliquotted on ice and stored at -80°C within 2 333  
hours. 334

Blood samples will be used to : 335

-Measure the peripheral inflammatory status by measuring blood levels of circulating pro- 336  
inflammatory markers IL-1, IL-6, IL-8, TNF-R1, TNF-R2, MCP-1,  $\alpha$ 1- ACT, sCD40L and 337  
hsCRP. 338

-Retrospectively validate the presence or absence of key pathogens identified by sequenc- 339  
ing at the systemic level in relevant patients. 340

Cytokine assays will be performed using the Meso Scale Discovery multiplex assay kit 341  
technology. These assays allow for the quantification of multiple analytes in the same 342  
sample, thus preserving samples and providing significant savings in terms of cost and 343  
laboratory time. The assays are performed in standard 96-well MULTI-SPOT plates that 344  
allow the quantification of up to 10 cytokines simultaneously using a maximum of 25  $\mu$ L 345  
of pure sample. 346

The presence of oral pathogens identified by qPCR sequencing as being of potential inter- 347  
est will be validated by standard type-specific PCR assays, retrospectively on the relevant 348  
oral samples, and also searched for in blood samples. 349

### 2.7. Sample size 350

With a power of 80%, an alpha error of 5% (2-sided test), an expected difference of 351  
1,300,000 pathogens between the AD group and the control group, and a standard devia- 352  
tion of about one quarter of the mean, we found that at least 39 subjects should be enrolled 353  
in each group. 354

## 2.8. Data collection, management, analysis 355

### 2.8.1. Data collection method 356

A unique identification code will be assigned to each subject. All documents, forms and 357  
data files will be labeled with this identification code. Each subject will be accounted for 358  
in the screening and enrollment file. Data from study participants will be collected in the 359  
form of anonymized case report forms (CRFs). The investigator will complete the CRF. 360  
The investigator will then enter and save the collected data in the study computer. The 361  
monitor will be informed that the CRF has been fully completed and that no changes have 362  
been made. The data will be checked by the monitor and used for internal evaluations. 363  
The data collected and the questionnaires will be archived for at least 10 years, personal 364  
data such as names, addresses and birthdays will not be kept. 365

### 2.8.2. Data management 366

Personal and experimental data will be analyzed without any personal characteristics us- 367  
ing a unique identification code. Subjects could be traced through the subject reidentifica- 368  
tion record, which is kept only at the clinical investigation site. Signed informed consent 369  
forms will be retained only at the clinical investigation site. 370

2.8.3. Statistical methods	376
The statistical analysis will start with a flat sort providing frequency tables for categorical variables (means and standard deviations, medians and extreme values), followed by comparisons between case and control groups.	377 378 379
The primary endpoint analysis will compare the amounts of bacteria and virus in the two groups. We will use Student's t-test or non-parametric Mann-Whitney U test, for quantitative variables, according to the number of subjects in the sample.	380 381 382
A secondary endpoint will analyse the clinical parameters such as the oral status and more specifically the periodontal status. We will use Chi square or non-parametric Fisher's exact test for qualitative variables and Student t test or Mann-Whitney U test for quantitative variables.	383 384 385 386
Another secondary endpoint will analyse blood cytokine and inflammatory markers as- correlation coefficient or Lin's concordance coefficient.	387 say. 388 class 389
The LOCF (last observation carried forward) method will be used to impute missing data. Before each analysis is carried out, the conditions of application of the tests used will be checked. The various tests will be considered significant at the 5% level.	390 391 392 393
<b>2.9. Ethic statement</b>	394
Protocol and design of the ORAMICAL study were approved by the ethical and regulatory authorities and will be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The ethical committee "Protection of Individual board of Ile de France V" (France) approved the protocol on August 4, 2021 (National registration number 2021-A01501-40). This study was registered at ClinicalTrials.gov (identification number NCT05077618).	395 396 397 398 399 400
<b>3. Discussion</b>	401
To our knowledge, the ORAMICAL study will be the first clinical case-control study to analyse the bacterial and viral periodontal microbiota of people aged 70 and over, according to whether they suffer from AD. Few previous studies have been performed before mainly focused on bacterial periodontal biofilm analysis in AD patients over 70 years of age [30-33]. Instead of these previous studies that analysed databases [30,32,33], our study aims to be an observational study. This will allow us to obtain a higher reliability of the periodontal criteria measurements and the samples taken, due to a controlled calibration of the dental examiners. Furthermore, in addition to the analysis of classical periodontopathogenic bacteria, we aim to investigate the presence of the 9 HHVs : this is a quite innovative approach to bring new significant insights to our knowledge of the periodontal flora in AD-patients. Last, high- throughput PCR amplification method, based on microfluidic technology (BioMark), allows the simultaneous and sensitive detection of dozens of pathogens in hundreds of specimens. This breakthrough technology now makes it possible to map the oral flora in a broad, but targeted way, in order to establish accurate microbial signatures linking a few set of pathogens with a specific pathogenic condition.	402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416
The primary outcome of this study will be to establish a periodontal microbiological map associated with AD. The choice to monitor AD by qualitative and quantitative analysis of the periodontal microbiota seems relevant since AD is likely to be linked to the dysbiosis of the gingival microbiota, and the presence of specific periodontal bacteria and/or bacterial complexes [46-48]. Periodontal bacteria have been identified in the brain tissue of AD patients [22,23,49]. The bacteria to be studied were determined through the previously identified periodontal bacteria related to AD [30-33] and the fact that the onset of PD is associated with six major Socransky bacterial complexes [46]. The bacteria of the green, blue, purple or yellow complex ( <i>An</i> , <i>Ec</i> , <i>Sm</i> , <i>So</i> , <i>Ss</i> , ...) are the pioneer ones. They are often present in the healthy symbiotic microbiota and allow the attachment and organisation of	417 418 419 420 421 422 423 424 425 426



orange and red complex bacteria. The presence of orange complex bacteria (*Pi*, *Cr*, *Fn*, *Pn*, 427 *En*, *P.micros*, and *P.melaninogenica*) is associated with dysbiosis of the subgingival micro- 428 biota. Finally, red complex bacteria (*Pg*, *Tf*, *Td*) adhere which is supposed to be linked to 429 PD. In addition, the analysis of the 9 human herpes viruses known to be present in the 430 oral cavity, some of which are known to be linked to AD, will complete the mapping of 431 the sulcal microbiota associated with AD. Studies have shown that increased abundance 432 of HSV-1 and HHV-6A/7 is observed in the brains of deceased AD patients [50], and the 433 interaction between CMV and HSV-1 is significantly associated with the risk of developing 434 AD [21]. In addition, aggressive antiviral treatment of HV is associated with a subsequent 435 decrease in AD incidence [50]. 436

Our analyses would allow correlation with data identified in the current literature. We 437 will perform both bacterial and viral sequencing, so that the results could be expected to 438 be more comprehensive and therefore more meaningful. The multiplex PCR method of 439 the Biomark HD system, which will follow a traditional real-time PCR method, will allow 440 the simultaneous quantification of all bacterial species on all available samples on the one 441 hand and all viral species on all available samples on the other hand, thus allowing a 442 comparison of the results obtained from both techniques. The Biomark HD system will 443 allow thousands of individual PCR reactions to be performed simultaneously using mi- 444 crofluidic technology. The PCR reactions are in the order of a few nanolitres. This system 445 is adapted to our panel of microbiological agents to be detected (9 viruses and 15 bacteria) 446 and it will thus be possible to analyse several hundred samples simultaneously. This tech- 447 nology is robust, sensitive and, moreover, very economical as it allows us to obtain more 448 data using fewer reagents and in less time. 449

The secondary outcomes of this study will analyse data regarding the oral status of the 450 patients. This should permit to better understand the link between the PD and AD. Tooth 451 loss, which is a consequence of PD, would lead to a decrease in the quality of nutrition, 452 and thus a decrease in the intake of vitamins and nutrients, which are essential for the 453 health of the central nervous system [51]. Thus, improving the plaque index could affect 454 the masticatory coefficient and thus the nutritional quality. In addition, improving the 455 plaque index favourably alters the oral microbiological composition [53-55] and may re- 456 duce the impact of oral pathogens on neuronal pathology. Another secondary outcome 457 will analyze blood levels of inflammatory markers and retrospectively validate the pres- 458 ence or absence of key pathogens identified by sequencing at the systemic level in relevant 459 patients. 460

Chronic periodontitis is linked to increased levels of pro-inflammatory cytokines in the 461 blood, such as TNF, IL-6, IL-10, IL-8 and CPR, all of which are involved in the progression 462 of several chronic diseases, including neurodegenerative disorders [56]. Cross-sectional 463 studies have shown that the presence of periodontitis, or antibodies to common periodon- 464 tal bacterial flora, is associated with an increase in a systemic pro-inflammatory state char- 465 acterised by an increase in serum CRP, TNF $\alpha$  [57] and TNF $\alpha$  / IL10 [58] ratios in partici- 466 pants with AD. These cytokines can induce systemic inflammation potentially capable of 467 increasing brain cytokine production, via olfactory or trigeminal nerve fibres [7]. 468

The pathogens most involved appear to be *Pg*, *Fn*, *An*, *Pi* and *Pd*. One study showed that 469 the *Fn* load was significantly higher in AD than in controls [33], while a similar association 470 was found between the pro-inflammatory state and the presence of IgG antibodies to *Pg*, 471 which are usually associated with the presence of periodontitis [31]. 472

The main finding of another study was that high serum IgG levels of *An* were associated 473 with an increased risk of AD incidence [32]. Although high levels of antibodies to *An* are 474 associated with periodontal health [59], plaque biofilms include high proportions of *An*, 475 and it probably has a strong pathogenic role in osteoclast activation and alveolar bone 476 loss, similar to that of Gram-negative organisms such as *Pg*. Another case-control study 477

showed that participants with high levels of *Fn* and *Pi* had a higher risk of AD. Similarly, the risk of developing dementia was higher in patients with *Pd* than in controls (HR = 1.16, 95% CI = 1.01-1.32,  $p = 0.03$ ) [23]. However, the clinical significance of a strong antibody response to a specific periodontal microbiota is uncertain, and antibody responses to periodontal bacteria may be influenced by multiple factors such as race/ethnicity, smoking or other health behaviours [60]. However, it is notable that serum antibody levels to periodontal pathogens remain relatively stable after periodontal treatment and are significantly lower in periodontally healthy subjects, suggesting that antibody levels signify cumulative exposure to oral pathogens and may help to distinguish between subjects with high and low susceptibility to severe disease [61].

Restoring the symbiosis of the supragingival microbiota may represent an accessible means of reducing the incidence of major neurocognitive disorders in the elderly. Therefore it would justify oral health monitoring and more systematic dental management in the elderly. Thus, this study could help to optimise oral health recommendations in the oldest populations and to promote interdisciplinarity for the benefit of patients.

#### 4. Conclusion

In conclusion, the ORAMICAL study will determine whether oral biomarkers are associated with AD.

This study thus represents a first step towards a larger clinical study and, ideally, a cohort which would encompass a large panel of elderly populations with or without AD and would allow long-term follow-up of these patients in order to analyse the evolution of their oral health status and the composition of their periodontal microbiota in relation to the evolution of AD. Such a follow-up would perhaps allow to affirm a direct and certain link between PD and AD, by identifying a set of oral bacteria and viruses as potential biomarkers of AD, and thus to prevent the worsening of the oral condition or even an improvement of the latter, especially as oral hygiene proceedings are often made difficult by advancing age and declining health status, thus increasing the risk of periodontal disease.

This new information could help oral health professionals as well as geriatric and neurodegenerative professionals in the prevention and/or treatment of AD.

**Supplementary Materials:** Table 1: SPIRIT-Checklist

**Author Contributions:** Conceptualization, L.L. and A.D.; methodology, L.B., S.V.B., G.S., F.C., M.C. and P.T.; validation, L.B., G.S., L.L. and A.D.; writing—original draft preparation, L.B.; writing—review and editing, L.B., L.L. and A.D.; supervision, A.D. and L.L.; funding acquisition, L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

**Funding:** This research was funded by the Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation of University Hospital of Nice (Centre Hospitalier Universitaire de Nice, public sector, 2021), as the project was selected following an internal call for projects, grant number 21-AOI-05.

**Institutional Review Board Statement:** “The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of “Protection of Individual board of Ile de France V” (France) (National registration number 2021-A01501-40, August 4, 2021).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We warmly thank the Drs Bereder I. and Michel E. for their collaboration.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

- References** 528
1. Prince, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Ali, G.-C.; Wu, Y.-T.; Matthew, P. World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, Cost and Trends. *Alzheimer's Dis. Int.* **2015**, *87*, 84. 529
  2. World Health Organization. Global Burden of Disease 2004 Update: Disability Weights for Diseases and Conditions. Geneva: World Health Organization. Available online: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=World+Health+Organization.+Global+Burden+of+Disease+2004+Update%3A+Disability+Weights+for+Diseases+and+Conditions.+Geneva%3A+World+Health+Organization%3B+2004> (accessed on 30 April 2021). 530-536
  3. Kent, S.A., Spires-Jones, T.L., Durrant C.S. The physiological roles of tau and A $\beta$ : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol.* **2020**, *140*(4):417- 47. 537-539
  4. Breijyeh, Z.; Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* **2020**; *25*(24):5789. 540-542
  5. A Armstrong, R. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* **2019**; *57*(2):87-105. 543-544
  6. Ranjan, R, Abhinay, A, Mishra, M. Can oral microbial infections be a risk factor for neurodegeneration? A review of the literature. *Neurol India.* **2018**, *66*(2):344-351. 545-547
  7. Dioguardi, M, Di Gioia, G, Caloro, GA, Capocasale, G, Zhurakivska, K, Troiano, G, Lo Russo, L, Lo Muzio, L., Dent J. The Association between Tooth Loss and Alzheimer's Disease: a Systematic Review with Meta-Analysis of Case Control Studies. *Dent J(Basel).* **2019**, *1*;7(2):49. 548-550
  8. Dioguardi, M, Crincoli, V, Laino, L, Alovisi, M, Sovereto, D, Mastrangelo, F, Lo Russo, L, Lo Muzio, L. The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*(2):495. 551-554
  9. Ashraf, G.M. Tarasov V.V ; Makhmutova, A.; Chubarev, V.N.; Avila-Rodriguez, M.; Bachurin S.O.; Aliev, G. The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *56*(6):4479-4491. 555-557
  10. Olsen, I; Singhrao, S. K. Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? *J Oral Microbiol.* **2015**, *7*:29143. 558-559
  11. Pritchard, A;B.; Crean, S.; Olsen, I; Singhrao, S;K. Periodontitis, Microbiomes and their Role in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* **2017**, *9*:336. 560-562
  12. Borsa, L.; Dubois, M.; Sacco, G.; Lupi, L. Analysis the Link between Periodontal Diseases and Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Int J Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9312. 563-565
  13. Nazir, M.A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim).* **2017**, *11*(2): 72-80. 566-568
  14. Frencken, J.E.; Sharma, P.; Stenhouse, L.; Green, D.; Laverty, D.; Dietrich, T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol.* **2017**, *44* Suppl 18:S94-S105. 569-570
  15. Eke, P.I. ; Dye, B.A. ; Wei, L. ; et al. Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol.* **2015**, *86*(5):611-622. 571-572
  16. Mohamed, H.G.; Idris, S.B.; Mustafa, M.; Ahmed, M.F.; Åström, A.N.; Mustafa, K.; et al. Impact of Chronic Periodontitis on Levels of Glucoregulatory Biomarkers in Gingival Crevicular Fluid of Adults with and without Type 2 Diabetes. *PLoS One.* **2015**, *10*(5): e0127660. 573-576
  17. Mattila, K.J.; Pussinen, P.J.; Paju, S. Dental infections and cardiovascular diseases : a review. *J Periodontol.* **2005**, *76*(11): S2085-8. 577-578
  18. Han Y.W.; Houcken, W.; Loos, B.G.; Schenkein, HA.; Tezal, M. Periodontal disease, atherosclerosis, adverse pregnancy outcomes and head-and-neck cancer. *Adv Dent Res.* **2014**, *26*(1): 47-55. 579-580

19. Bourgeois, D.; Inquimbert, C.; Ottolenghi, L.; Carrouel, F. Periodontal Pathogens as Risk Factors of Cardiovascular Diseases, Diabetes, Rheumatoid Arthritis, Cancer, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Is There Cause for Consideration? *Microorganisms*. **2019**, *7*(10):424. 582-584
20. Gare, J.; Kanoute, A.; Meda, N.; Viennot, S.; Bourgeois, D.; Carrouel, F. Periodontal conditions and Pathogens associated with pre-eclampsia: a scoping review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*(13):7194. 585-588
21. Lövhheim, H.; Olsson, J.; Weidung, B.; Johansson, A.; Eriksson, S.; Hallmans, G.; Elgh, F. Interaction between Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Type 1 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease Development. *J. Alzheimers Dis.* **2018**; *61*(3):939-945. 589-591
22. Miklossy, J. Historic evidence to support a causal relationship between spirochetal infections and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* **2015**, *7*:46. 592-594
23. Sparks Stein, P.; Steffen, M.J.; Smith, C.; Jicha, G.; Ebersole J.L.; Abner, E.; Dawson, D. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2012**, *8*(3): 196-203. 595-598
24. Chen, C.; Feng, P.; Slots, J. Herpesvirus-bacteria synergistic interaction in periodontitis. *Periodontol 2000.* **2020**, *82*(1):42-64. 599-600
25. Contreras, A.; Botero, J.E.; Slots, J. Biology and pathogenesis of cytomegalovirus in periodontal disease. *Periodontol 2000.* **2014**, *64*(1):40-56. 601-603
26. Vincent-Bugnas, S.; Vitale, S.; Mouline, C.C.; Khaali, W.; Charbit, Y.; Mahler, P.; Prêcheur, I.; Hofman, P.; Maryanski, J.L.; Doglio, A. EBV infection is common in gingival epithelial cells of the periodontium and worsens during chronic periodontitis. *PLoS One.* **2013**, *8*(12):e80336. 604-606
27. Agostini, S.; Mancuso, R.; Costa A.S.; Citterio, L.A.; Guerini, F.R.; Meloni, M.; Navarro, J.; Clerici, M. A Possible Role for HSV-1 Specific Humoral Response and PILRA rs1859788 Polymorphism in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Vaccines (Basel).* **2021**, *9*(7):686. 607-610
28. Carbone, I.; Lazzarotto, T.; Ianni, M.; Porcellini, E.; Forti, P.; Masliah, E.; Gabrielli, L.; Licastro, F. Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease. *Neurobiol Aging.* **2014**, *35*(1):122-9. 611-613
29. Hogestyn, J.M.; Mock, D.J.; Mayer-Proschel, M. Contributions of neurotropic human herpesviruses herpes simplex virus 1 and human herpesvirus 6 to neurodegenerative disease pathology. *Neural Regen Res.* **2018**, *13*(2): 211-221. 614-616
30. Beydoun, M.A.; Beydoun, H.A.; Hossain, S.; El-Hajj, Z.W.; Weiss, J.; Zonderman, A.B. Clinical and Bacterial Markers of Periodontitis and Their Association with Incident All-Cause and Alzheimer's Disease Dementia in a Large National Survey. *J. Alzheimers Dis.* **2020**, *75*(1): 157-172. 617-620
31. Ide, M.; Harris, M.; Stevens, A.; Sussams, R.; Hopkins, V.; Culliford, D.; Fuller, J.; Ibbett, P.; Raybould, R.; Thomas, R.; et al. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PLoS One.* **2016**, *11*(3): e0151081. 621-623
32. Noble, J.M.; Scarmeas, N.; Celenti, R.S.; Elkind, M.S.V.; Wright, C.B.; Schupf, N.; Papapanou, P.N. Serum IgG Antibody Levels to Periodontal Microbiota Are Associated with Incident Alzheimer Disease. *PLoS One.* **2014**, *9*(12): e114959. 624-626
33. Panzarella, V.; Mauceri, R.; Baschi, R.; Maniscalco, L.; Campisi, G.; Monastero, R. Oral Health Status in Subjects with Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Data from the Zabút Aging Project. *J. Alzheimer's Dis.* **2020**, *82*, 1-11. 627-630
34. Liu, X.X.; Jiao, B.; Liao, X.X.; Guo, L.N.; Yuan, Z.H.; Wang, X.; Xiao, X.W.; Zhang, X.Y.; Tang, B.S.; Shen, L. Analysis of Salivary Microbiome in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* **2019**, *72*(2):633-640. 631-633
35. Chan, A.W.; Tetzlaff, J.M.; Göttsche, P.C.; Altman, D.G.; Mann, H.; Berlin, J.A.; Dickersin, K.; Hróbjartsson, A.; Schulz, K.F.; Parulekar, W.R.; Krleža-Jeric, K.; Laupacis, A.; Moher, D. SPIRIT 2013 explanation and elaboration: guidance for protocols of clinical trials. *BMJ.* **2013**, *346*: e7586. 634-636

36. Von Elm, E.; Altman, D.G.; Egger, M.; Pocock, S.J.; Gøtzsche, P.C.; Vandenbroucke, J.P. STROBE Initiative. The strengthening 637 the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Int J 638 Surg.* **2014**, *12*(12):1495-99. 639
37. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed.; American Psychiatric Publishing: 640 Arlington, VA, 2013; pp. 5-25. 641 642 643
38. McKhann, G.M.; Knopman, D.S.; Chertkow, H.; Hyman, B.T.; Jack, C.R.; Kawas, C.H. et al. The diagnosis of dementia due to 644 Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnos- 645 tic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2011**, *7*(3):263-9. 646 647
39. Berard, A. (Victor Segalen University, Bordeaux 2, Bordeaux, France); Poisson, P. (Victor Segalen University, Bordeaux 2, Bor- 648 deaux, France); Bourdel-Marchasson, I. (Bordeaux University, Bordeaux, France); Dupuis, V. (Bordeaux University, Bordeaux, 649 France). Removable prosthesis improves body mass index in elderly people. September. Poster presentation at the IADR/PER 650 General Session (London), 2018. 651 652
40. Muhlemann, H.R. Physiologic and pathologic dental mobility. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd.* **1951**, *61*(1): 1-71. 653 654
41. Klein, H.; Palmer, C.E. Studies on dental caries: X. a procedure for the recording and statistical processing of dental examination 655 findings. *J Dent Res.* **1940**, *19*(3): 243-56. 656 657
42. Caton, J.G.; Armitage, G.; Berglundh, T.; Chapple, I.L.C.; Jepsen, S.; Kornman, K.S.; Mealey, B.L.; Papapanou, P.N.; Sanz, M.; 658 Tonetti, M.S. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key 659 changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* **2018**, *89* Suppl 1:S1-S8. 660 661
43. Ainamo, J.; Bay, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* **1975**, *25*(4):229-35. 662 663
44. O'Leary, T.J.; Drake, R.B.; Naylor, J.E. The plaque control record. *J Periodontol.* **1972**, *43*(1):38. 664 665
45. Goecke, N.B.; Hjulsager, C.K.; Krog, J.S.; Skovgaard, K.; Larsen, L.E. Development of a high-throughput real-time PCR system 666 for detection of enzootic pathogens in pigs. *J Vet Diagn Invest.* **2020**, *32*(1):51-64. 667 668
46. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* **2005**, *38*:135-187. 669 670
47. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C.; Kent, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 671 **1998**, *25*(2):134-144. 672 673
48. Noble, J.M.; Borrell, L.N.; Papapanou, P.N.; Elkind, M.S.; Scarmeas, N.; Wright, CB. Periodontitis is associated with cognitive 674 impairment in older adults: analysis of NHANES-III. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **2009**, *80*(11):1206-11. 675 676
49. Dominy, S.S.; Lynch, C.C.; Ermini, F.; Benedyk, M.; Markzyc, A.; Konradi, A.; Nguyen, M.; Haditsch, U.; Raha, D.; Griffin, C.; 677 et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for causality in disease and treatment with small mole- 678 cule inhibitors. *Sci Adv.* **2019**, *5*(1): eaau3333. 679 680
50. Hogestyn, J.M.; Mock, D.J.; Mayer-Proschel, M. Contributions of neurotropic human herpesviruses herpes simplex virus 1 and 681 human herpesvirus 6 to neurodegenerative disease pathology. *Neural Regen Res.* **2018**, *13*(2): 211-221. 682 683
51. Tzeng, NS.; Chung, C.H.; Lin, F.H.; Chiang, C.P.; Yeh, C.B.; Huang, S.Y.; Lu, R.B.; Chang, H.A.; Kao, Y.C.; Yeh, H.W.; Chiang, 684 W.S.; Chou, Y.C.; Tsao, C.H.; Wu, Y.F.; Chien, WC. Anti-herpetic Medications and Reduced Risk of dementia in patients with 685 Herpes Simplex Virus Infections-a Nationwide, Population-based Cohort Study in Taiwan. *Neurotherapeutics.* **2018**, *15*(2): 417- 686 429. 687 688
52. Perrone, D.; Ardito, F.; Giannatempo, G.; Dioguardi, M.; Troiano, G.; Lo Russo, L.; De Lillo, A.; Laino L.; Lo Muzio, L. Biological 689 and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *Exp. Ther. Med.* **2015**, *10*(5): 1615-1623. 690 691

53. Theilade, E.; Wright, W.H.; Jensen, S.B.; Løe, H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontol Res.* **1966**, *1*:1-13. 692  
693  
694
54. Ritz, H.L. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch Oral Biol.* **1967**, *12*(12):1561-8. 695  
696
55. Marsh, P.D.; Bradshaw, D.J. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* **1995**, *15*(3):169-75. 697  
698
56. Cestari, J.A.; Fabri, G.M.; Kalil, J.; Nitrini, R.; Jacob-Filho, W.; De Siqueira, J.T.; Siqueira, S.R. Oral infections and cytokine levels in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment compared with controls. *J Alzheimers Dis.* **2016**, *52*, 1479–1485. 699  
700  
701  
702
57. Kamer, A.R.; Craig, R.G.; Pirraglia, E.; Dasanayake, A.P.; Norman, R.G.; Boylan, R.J.; Nehorayoff, A.; Glodzik, L.; Brus, M; de Leon, M.J. TNF-alpha and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *J Neuroimmunol.* **2009**, *216*: 92–97. 703  
704  
705  
706
58. Farhad, S.Z.; Amini, S.; Khalilian, A.; Barekatin, M.; Mafi, M.; Barekatin, M.; Rafei, E. The effect of chronic periodontitis on serum levels of tumor necrosis factor-alpha in Alzheimer disease. *Dent Res J (Isfahan).* **2014**, *11*: 549–552. 707  
708  
709
59. Dye, B.A.; Herrera-Abreu, M.; Lerche-Sehm, J.; Vlachojannis, C.; Pikdoken, L.; Pretzl, B.; Schwartz, A.; Papapanou, P.N. Serum antibodies to periodontal bacteria as diagnostic markers of periodontitis. *J Periodontol.* **2009**, *80*: 634–647. 710  
711  
712
60. Vlachojannis, C.; Dye, B.A.; Herrera-Abreu, M.; Pikdoken, L.; Lerche-Sehm, J.; Pretzl, B.; Celenti, R.; Papapanou, R.N. Determinants of serum IgG responses to periodontal bacteria in a nationally representative sample of US adults. *J Clin Periodontol.* **2010**, *37*: 685–696. 713  
714  
715  
716
61. Papapanou, P.N.; Neiderud, A.M.; Disick, E.; Lalla, E.; Miller, G.C.; Dahlén, G. Longitudinal stability of serum immunoglobulin G responses to periodontal bacteria. *J Clin Periodontol.* **2004**, *31*: 985–990. 717  
718



SUPPLEMENTARY MATERIAL. TABLE 1. SPIRIT 2013 Checklist for the ORAMICAL study.

Section/item	Item No	Description
<b>Administrative information</b>		
Title	1	Periodontal microbiota in elderly people diagnosed with and without Alzheimer's disease: a case-control study protocol (ORAMICAL: Oral microbiology in Alzheimer's patients)
Trial registration	2a	Ethical committee Protection of Individual board of Ile de France V: 2021-A01501-40 ClinicalTrials.gov: NCT05077618
	2b	All items from the World Health Organization Trial Registration Data Set: Not applicable
Protocol version	3	July 6, 2021 – version 1 August 4, 2021 – version 2
Funding	4	Specific grant from the Centre Hospitalier Universitaire de Nice (public sector)

Roles and responsibilities

- 5a Dr Leslie Borsa<sup>1,2,3</sup>  
Pr Séverine Vincent-Bugnas<sup>4,2,3</sup>  
Dr Guillaume Sacco<sup>5,6,7</sup>  
Dr Florence Carrouel<sup>8</sup>  
Dr Marlène Chevalier<sup>3</sup>  
Dr Paul Tramini<sup>9</sup>  
Pr Laurence Lupj<sup>1,2,3</sup>  
Dr Alain DOGLIO<sup>3,10</sup>  
<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Département de Santé Publique, 06353 Nice, France.  
<sup>2</sup>Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle Odontologie, 06000 Nice, France.  
<sup>3</sup>Université Côte d'Azur, Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, UPR7354 - Laboratoire Microbiologie orale, Immunothérapie et Santé (Micoralis), 06353 Nice, France.  
<sup>4</sup>Université Côte d'Azur, Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Département de Santé Publique, 06353 Nice, France.  
<sup>5</sup>Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Clinique Gériatrique du Cerveau et du Mouvement, 06003 Nice, France;  
<sup>6</sup>Université Côte d'Azur, CoBTeK, 06100 Nice, France  
<sup>7</sup>Univ Angers, Université de Nantes, LPPL, SFR CONFLUENCES, 49000 Angers, France  
<sup>8</sup>Health, Systemic, Process, EA4129 Research Unit, University Claude Bernard Lyon 1, University of Lyon, 69372 Lyon, France  
<sup>9</sup>Université de Montpellier, Faculté de Chirurgie Dentaire-Odontologie, Département de Santé Publique, Montpellier, France  
<sup>10</sup>Unité de Thérapie Cellulaire et Génique (UTCG), Centre Hospitalier Universitaire de Nice, 06101, Nice, France

**Author's contributions:**

AD conceived of the study. LB, SV, GS and LL initiated the study design and FC and MC helped with implementation. LB, SV, GS, LL and AD are grant holders. LB is the principal investigator of the study. PT provided statistical expertise in clinical trial design. All authors contributed to refinement of the study protocol and approved the final manuscript.

- 5b Centre Hospitalier Universitaire de Nice,  
Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation Hôpital de Cimiez  
Adress : 4, av Reine Victoria BP1179 06003 Nice cedex 01 Telephone:  
04 92 03 40 – email :drc@chu-nice.fr
- 5c This funding had no role the design of the study and will not have ultimate authority over any of the following activities: execution, analyses, interpretation of the data or decision to submit results.



- 5d **AD (microbiologist, laboratory director) and LB (dentist, principal investigator)**
- Design and conduct of ORAMICAL
  - Protocol and revisions
  - Drafting of the informed consent form
  - Organising steering committee meetings
  - Members of TMC [Trial Management Committee]
- Steering committee (SC): all members are named in the title page**
- Agreement of final protocol
  - LB and GS: Recruitment of patients
  - Reviewing progress of study and if necessary agreeing changes to the protocol.
- Trial management committee (TMC) : AD, LB, GS (geriatrician, investigator), SV (parodontologist, investigator), LL (dentist, investigator) and clinical research associate (DRCI, CHU de Nice)**
- Study planning
  - Organisation of the meetings
  - Responsible for trial file
  - Budget administration and contractual issues
  - Advice for principal investigator
  - Assistance with international review, board/independent ethics committee applications
  - Data verification
  - Randomisation
  - Organisation of the inclusions
- Clinical research assistant**
- Maintenance of trial IT system and data entry
  - Data verification

## Introduction

- Background and rationale
- 6a **Introduction:** Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of neurocognitive impairment in the adult population. PD is a chronic inflammatory disease related to dysbiosis of the gingival microbiota. PD is one of the most common inflammatory diseases, affecting about 50% of the world's population. Moreover, PD represents a key risk factor of systemic diseases.
- Mechanisms:** Oral bacteria and HV viruses have been found in the brains of deceased AD patients, supporting the hypothesis of diffusion of infectious/inflammatory agents from the BC to the brain.
- Existing knowledge:** Recent studies have shown an increase in *F. nucleatum* in AD patients (adjusted  $p = 0.02$ ), AD incidence associated with *C. rectus*, *P. gingivalis* (adjusted HR = 1.22 (1.04-1.43),  $p = 0.012$ ) and *A. naeslundii* ((HR)2.0, 95% CI: 1.1-3.8). The presence of periodontitis at baseline is furthermore associated with a 6-fold increase in the rate of cognitive decline over a 6-month follow-up period (mean change in ADAS-Cog =  $2.9 \pm 6.6$ ). These data suggest an association between periodontal disease (PD) and AD.
- Need for trial:** While there is evidence of a favourable trend towards an association between PD and AD, there is no real knowledge of the degree of association or causal relationship between these conditions due to the heterogeneity of condition definitions and methodologies used in the studies.
- There is therefore a real need for prospective observational studies:
- Classifying PD comprehensively (type-extension-severity)
  - Unequivocally define the type of dementia studied
  - Including homogeneous and representative study populations
- To our knowledge, ORAMICAL will be the first case-control clinical study to analyse the bacterial and viral periodontal microbiota of people aged 70 years and over, according to whether they have AD or not.
- If periodontal markers are found to predict the development or progression of AD, diagnosis and follow-up of older people could be facilitated and treatment of PD could be a means of preventing AD.
- 6b In order to study the periodontal microbiota of patients with non- genetic forms of AD, thus targeting affected and unaffected people aged 70 and over.

Objectives	7	<p><b>Research hypothesis:</b> The research question is, according to the PICO principles: Areseniors aged 70 and over (Population) with AD (Intervention) compared with AD-free seniors (Control) carriers of specific periodontal bacteria and viruses (Outcome) in terms of quality or quantity in their periodontal microbiota ?</p> <p><b>Study objectives:</b> <u>The primary objective will be to:</u> compare qualitatively and quantitatively periodontal bacterial and viral species present in the periodontal microbiota from 70 years old's people with and without AD in order to determine a periodontal microbiological signature specific to AD. <u>The secondary objectives will be to:</u> 1/Compare the dental condition of patients with AD and control subjects. 2/Compare periodontal status of patients with AD and control subjects. 3/Compare the level of oral hygiene of patients with AD and control subjects. 4/Compare blood levels of inflammatory markers of patients with AD and control subjects. 5/Validate sequencing data by "specific type" qPCR: The presence of oral pathogens identified by sequencing as potentially of interest will be validated by classical specific type PCR analyses, retrospectively on the oral samples concerned, and also looked for in blood samples.</p>
Trial design	8	<p>The ORAMICAL study is designed as a non-randomized case-control clinical study (Figure 1). This study will be carried out on people aged 70 and over, with (cases) or without (controls) AD.</p>
<b>Methods: Participants, interventions, and outcomes</b>		
Study setting	9	<p>This study will be conducted at the Nice University Hospital, France, in the departments of geriatrics and odontology.</p>

Eligibility criteria 10 **The individual inclusion criteria for the “case” group will be:**  
(i) age 70 and over, (ii) major neurocognitive impairment in probable AD, established after lumbar puncture biomarker testing, and minor neurocognitive impairment in possible AD (without lumbar puncture biomarker testing), according to DSM-V criteria [37], generally including different aspects such as a cognitive assessment (including a global evaluation, usually with the MMSE), a functional assessment (IADL or ADL scales), a behavioral assessment, a clinical examination, and para-clinical examinations. In the case of a possible diagnosis, or for ages over 80 years, biomarker testing is not indicated if the disorders are major/blatant, and characterization will also be performed using magnet resonance imaging (MRI) [38], the diagnosis will be done by a geriatrician, and (iii) the participant or his/her guardian, if applicable, agrees to the terms and conditions of the study and signs the informed consent form.

**The individual inclusion criteria will be for the control group:**  
(i) age 70 and over, (ii) senior AD-free, and (iii) the participant agrees to the terms and conditions of the study and signs the informed consent form.

**The dental inclusion criteria will be:**  
(i) at least one tooth present in the mouth.

**The individual exclusion criteria will be:**  
(i) the presence of a neurodegenerative pathology (excluding AD for cases), (ii) the presence of a neurocognitive disorder (excluding AD for cases), (iii) the presence (current or past) of any kind of cancer, including oral or aerodigestive tract, (iv) the presence of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (RA) or Gougerot- Sjogren's syndrome (GSS), (v) viral diseases (AIDS, viral hepatitis), (vi) the presence of severe haemopathy, (vii) the presence of severe acute or chronic cardiovascular, renal, hepatic, gastrointestinal disease (viii) the presence of acute or chronic severe cardiovascular, renal, hepatic, gastrointestinal, allergic, endocrine, pulmonary or neuropsychiatric condition deemed by the investigator to be incompatible with the study as it may interfere with the results of the oral flora sampling, (ix) a history of oral surgery within the two months preceding the sampling (x) a history of treatment with oral retinoids, bisphosphonates, oral anticoagulants or anticonvulsants, (xi) a history of antibiotic, anti-inflammatory or mouthwash treatment within the last 4 weeks.

- Interventions 11a The intervention will be carried out during one visit (intervention visit). The dental examination will be carried out by a trained and calibrated dentist having a good knowledge of the clinical clues studied. The dentist will repeat with the patient the medical examination previously performed. The oral condition will be assessed by the following parameters (i) presence and level of dental prostheses fitting (ii), geriatric masticatory coefficient, (iii) presence of tooth mobility and its gradation according to Muhlemann's classification, (iii) number of tooth decay (if present) by the DMFT index.
- A charting of the clinical periodontal parameters will be performed including periodontal pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing index (BOP) and plaque index (PI), on the tooth from which the microbiological sample is taken.
- Sampling will be taken by the dentist from the tooth showing the most severe pocket depth (PPD). In the case of similar pocket depths in the same mouth, the tooth sampled will be the right upper first molar or , in case of loss, the left upper first molar, or the nearest straight upper molar, or the nearest left upper molar, or the right lower 1st molar, or the nearest left lower molar, or the nearest tooth. The tooth selected for sampling will be isolated with sterile dental swabs. Periodontal sampling will be taken with a sterile paper point (paper point n°25 or n°30 (blister of 5) ; product n° 289608, references A022T00002500 and A022T00003000 ; Dentsply Sirona) left in place 30 seconds and a dental plaque sample will be taken by scraping with a periodontal curette.
- A venous blood sampling for serological study and peripheral pathogen detection will be performed by a nurse from the geriatric department.
- 11b Criteria for discontinuing will be participant or legal representative request. The only risk is that of a small transitory bleeding of the gum, so the risk is minimal.
- 11c No strategies to improve adherence to intervention protocols, and no procedures for monitoring adherence, as the intervention will be done by a calibrated dentist during one intervention visit.
- 11d Relevant concomitant care and interventions that are permitted or prohibited during the trial: not applicable as there is only one intervention visit.

**Primary outcome measure:****Quantification of periodontal bacterial and viral species from dental plaque samples.**

Quantification of periodontal bacterial and viral species by real-time qPCRs and by microfluidic multiplex qPCRs (Fluidigm Biomark HD System)

9 Herpes viruses = HSV-1 and 2 (or HHV-1 and -2), VZV (or HHV-3), EBV (or HHV-4), CMV (or HHV-5), HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, HHV-8 (or Kaposi virus)

16 periodontal bacteria = Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythensis, Treponema denticola, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus, Fusobacterium nucleatum, Prevotella nigrescens, Eubacterium nodatum, Peptostreptococcus micros, Prevotella melaninogenica, Aa, Actinomyces naeslundii, Eikenella corrodens, Streptococcus mitis, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguis

For each species:

Less than 25 CT (Cycle Threshold): positive

More than 30 CT (Cycle Threshold): negative

Between 25 and 30 CT (Cycle Threshold): need to increase significance by using an additional primer

CT: allows to determine the number of copies of each bacterial or viral species

**Secondary outcomes measures:**

- **Oral status:**

**Presence of dentures:** Yes/No

**Geriatric masticatory coefficient:** A number of points is attributed for each tooth with or without antagonist (natural, or artificial removable tooth) as follows: 2 points for the upper central incisors, 1 point for the other incisors, 4 points for the canines, 3 points for the premolars, 2 points for the upper third molars, 3 points for the lower third molars and 5 points for the other molars. The total is 100 when all teeth are present.

**DMFT:** Number of Decayed Missing or Filled teeth (from 0 to 32)

- **Periodontal status:**

**Periodontal Pocket Dept (PPS):** Between the gum line and the bottom of the pocket, measures in mm.

**Clinical Attachment (CAL):** Between the enamel-cement junction and the bottom of the pocket, measures in mm.

**Bleeding on Probing (BoP):** Number of sites with bleeding divided by total number of sites measured x 100, measured as a percentage

**Plaque Index (PI):** From 0 to 3

- **Blood samples:**

-Measure of the peripheral inflammatory status by measuring blood levels of circulating pro-inflammatory markers IL-1, IL-6, IL-8, TNF-R1, TNF-R2, MCP-1,  $\alpha$ 1- ACT, sCD40L and hsCRP (pg/ml).

-Retrospective validation of the presence or absence of key pathogens identified by sequencing at the systemic level in relevant patients.

Participant timeline	13	<p>Participants will be recruited by a geriatrician.</p> <p>All potential participants, and/or their legal representatives, will receive an explanatory document about the study. If they wish, additional information can be provided to the referring practitioners on request. Those who agree to participate, and/or their legal representatives, will be orally informed and in writing about the modalities of their participation and the course of the study. A consultation visit to the dental chair of the Nice University geriatric hospital, France, will then be scheduled. During this visit, an oral examination will check the oral inclusion criteria, and microbiota samples will be collected.</p> <p>Participant timeline is represented by a schematic diagram (see Figure 2).</p>
Sample size	14	<p>With a power of 80%, an alpha error of 5% (2-sided test), an expected difference of 1,300,000 pathogens between the AD group and the control group, and a standard deviation of about one quarter of the mean, we found that at least 39 subjects should be enrolled in each group.</p>
Recruitment	15	<p>Strategy for achieving adequate participant enrolment to reach target sample size: All patients/legal representatives of patients who meet the inclusion and exclusion criteria consulting in the geriatric ward will be asked to participate in the study.</p> <p>Given the number of patients received in dental and geriatric consultations, the recruitment period will last approximately for 36 months.</p>

**Methods: Assignment of interventions (for controlled trials)**

Allocation:

Sequence generation	16a	<p>Method of generating the allocation sequence (eg, computer-generated random numbers), and list of any factors for stratification. To reduce predictability of a random sequence, details of any planned restriction (eg, blocking) should be provided in a separate document that is unavailable to those who enrol participants or assign interventions: Not applicable.</p>
Allocation concealment mechanism	16b	<p>Mechanism of implementing the allocation sequence (eg, central telephone; sequentially numbered, opaque, sealed envelopes), describing any steps to conceal the sequence until interventions are assigned: Not applicable.</p>
Implementation	16c	<p>The geriatrician will enrol participants.</p>
Blinding (masking)	17a	<p>Outcome assessors and data analysts will be blinded, a code will be associated to each participant.</p>
	17b	<p>The dentist and the geriatrician will be able to unblind the results at the end of the study.</p>

## Methods: Data collection, management, and analysis

- Data collection methods 18a **Training of evaluators :**  
The evaluating investigators are a geriatrician and a dentist with a good knowledge of geriatric and oral assessment tools. The oral swabs will be taken by the dental investigator who will have been trained in this respect.
- Medical tests:**  
The major neurocognitive impairment in probable AD will be established after lumbar puncture biomarker testing, and minor neurocognitive impairment in possible AD (without lumbar puncture biomarker testing) will be established according to DSM-V criteria, including different aspects such as a cognitive assessment (global evaluation with the MMSE), a functional assessment (IADL or ADL scales), a behavioral assessment, a clinical examination, and para-clinical examinations. In the case of a so-called possible diagnosis, or for ages over 80 years, biomarker testing is not indicated if the disorders are major/blatant, and characterization will also be performed using magnet resonance imaging (MRI).
- Laboratory tests :**  
Periodontal DNAs will be extracted from oral swabs with the QIAamp DNA Mini Kit (protocol A-B (Gram-) following the manufacturer's instructions (Qiagen, Venlo, Netherlands). Checking for DNA quality and quantities will be achieved through spectrophotometric analysis at 260 and 280 nm (nanodrop; Thermo Scientific NanoDrop 2000.) The eluted DNA will be kept stored at -20°C until further analysis. Detection of oral pathogens will then be performed first using conventional real-time qPCR technology (QuantStudio 5, Thermo Fisher Scientific) following recommendations in the literature. For high-throughput PCR amplification the IFC BioMark 48x192DA chip (Fluidigm) will be used.
- All blood samples will be centrifuged and aliquotted on ice and stored at -80°C within 2 hours.
- Cytokine assays will be performed using the Meso Scale Discovery multiplex assay kit technology. These assays allow for the quantification of multiple analytes in the same sample, thus preserving samples and providing significant savings in terms of cost and laboratory time. The assays are performed in standard 96-well MULTI-SPOT plates that allow the quantification of up to 10 cytokines simultaneously using a maximum of 25 µL of pure sample.
- The presence of oral pathogens identified by qPCR sequencing as being of potential interest will be validated by standard type-specific PCR assays, retrospectively on the relevant oral samples, and also searched for in blood samples.
- 18b Plans to promote participant retention and complete follow-up, including list of any outcome data to be collected for participants who discontinue or deviate from intervention protocols: Not applicable as there is only one intervention visit.



Data  
management

19 **Data forms and data entry:**

The original paper study forms will be filled out at the time of inclusion at the Nice University Hospital, and then kept in the archives of the MICORALIS Laboratory (Faculty of Odontology of Nice). The data will then be entered electronically into a protected file on an encrypted key. These data will then be deposited on a protected computer in the laboratory, and access to the file will only be possible with a password. Participants' files will be filed according to the code assigned to them and kept in a secure and accessible location.

**Coding system and confidentiality rules :**

Each tube will be numbered as follows:

-Tens digit = patient inclusion number.

-Digit = location of sample (if sulcular or scraping).

-Letter = type of sampling (scraping or intrasulcular sampling with paper tip).

Records will be kept for a period of 20 years after the end of the study.

**Consultation and control of data:**

The computerised file will be similar to the paper forms. As required by law, the computerised file will be declared to the CNIL (National Commission for Information technology and Liberties). The integrity of the data will be ensured by various mechanisms, including regular back-ups as the file grows.

Checks will be carried out at the time of data entry and before the data is entered into the database. Any changes made in the database will be documented. The data entered in the database will be available for consultation according to the privileges granted by the user's identification code and password.

**Data security and backup :**

All paper forms relating to the study data will be kept in a locked cabinet and offering sufficient guarantees of protection against fire, water damage, light or malicious damage. Access to the study data will be restricted. A password will be required to control access to the computerised system.

Data backups will be performed daily, and a full database backup will be performed twice a month.

**Computer equipment:**

Computer files will be transferred from an encrypted key to a secure computer in the Micoralis laboratory. The data will not be put online (intranet or internet).

Statistical  
methods

20a The statistical analysis will start with a flat sort providing frequency tables for categorical variables (means and standard deviations, medians and extreme values), followed by comparisons between case and control groups.

The primary endpoint analysis will compare the amounts of bacteria and virus in the two groups. We will use Student's t-test or non-parametric Mann-Whitney U test, for quantitative variables, according to the number of subjects in the sample.

A secondary endpoint will analyze the clinical parameters such as the oral status and more specifically the periodontal status. We will use Chi square or non-parametric Fisher's exact test for qualitative variables and Student t test or Mann-Whitney U test for quantitative variables.

Another secondary endpoint will analyze blood cytokine and inflammatory markers assay. The comparison of oral levels of pathogenic microorganisms will be done by intra-class correlation coefficient or Lin's concordance coefficient.

Before each analysis is carried out, the conditions of application of the tests used will be checked. The various tests will be considered significant at the 5% level.

20b Methods for any additional analyses (eg, subgroup and adjusted analyses): Not applicable.

20c Definition of analysis population relating to protocol non-adherence (eg, as randomised analysis), and any statistical methods to handle missing data (eg, multiple imputation): Not applicable.

**Methods: Monitoring**

Data monitoring	21a	<p>The creation of a Data Monitoring Committee (DMC) is not necessary as quality controls of the data will be carried out by the Clinical Research Associate (ARC) of the Clinical Research and Innovation Delegation (DRCI), mandated by the promoter.</p> <p>The nature and frequency of the monitoring will be established according to the procedure for defining the level of monitoring according to the established risk and will depend on the number of patients included, the rate of inclusion and the difficulties observed during the conduct of the study.</p> <p>The ARC will check, throughout the study, during planned monitoring visits with the investigator:</p> <p>The adequacy of the data collected during the study with the source documents (medical file, etc.)  medical file...)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ø Consents of all included patients</li> </ul> <p>In this respect, the investigator undertakes to make available to the ARC during his monitoring visits (the ARC is bound by confidentiality regarding the information he accesses)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ø Patients' medical records</li> <li>Ø Data collection books</li> <li>Ø Consent forms of the patients included</li> </ul> <p>This monitoring carried out by the ARCs will make it possible to evaluate:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ø The protection of individuals</li> <li>Ø The reliability of the data collected in relation to the source documents</li> <li>Ø Compliance of the trial with the protocol and with current legislation on research involving human persons</li> </ul> <p>At the end of this quality control, a monitoring report will be drawn up by the ARC and submitted to the DRCI, who will take directives based on the conclusions of this report.</p> <p>An inspection is an official control carried out by the ANSM (National Agency for the Safety of Medicines and Health Products) with the aim of assessing the admissibility of clinical data, verifying compliance with the legislation and the absence of fraud.</p> <p>The inspectors check the documents, logistics, records and any other resources that the authorities consider to be associated with the clinical trial.</p>
	21b	<p>Description of any interim analyses and stopping guidelines, including who will have access to these interim results and make the final decision to terminate the trial: Not applicable</p>
Harms	22	<p>Plans for collecting, assessing, reporting, and managing solicited and spontaneously reported adverse events and other unintended effects of trial interventions or trial conduct: Not applicable as the only risk is that of a small transitory bleeding of the gum.</p>

Auditing 23 The DRCI (Clinical Research and Innovation Delegation) of the Nice University Hospital will be in charge of verifying the conduct of the trial. It is independent of the investigators.

#### **Ethics and dissemination**

Research ethics approval 24 Protocol and design of the ORAMICAL study were approved by the ethical and regulatory authorities and will be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The ethical committee "Protection of Individual board of Ile de France V" (France) approved the protocol on August 4, 2021 (National registration number 2021-A01501-40).

Protocol amendments 25 Important protocol modifications will be provided in writing to relevant parties (eg, investigators, REC/IRBs, trial participants, trial registries, journals, regulators).

Consent or assent 26a The dentist will obtain informed consent or assent from potential trial participants or authorised surrogates, by informing them and asking them to sign an informed consent. (see Item 32)

26b Additional consent provisions for collection and use of participant data and biological specimens in ancillary studies, if applicable: Not applicable.

Confidentiality 27 All study information will be stored securely on the MICORALIS laboratory site. Participant information will be stored in locked cabinets. For confidentiality reasons, all laboratory samples, reports, data collection, process and administrative forms will be identified by a coded identification number. Computerized databases will be secured by passwords. Lists linking participants' identification numbers to other identifying information will be kept in a separate file and stored in a locked location.  
All results of the various tests carried out, if any, will be kept strictly confidential.  
Information about the study will not be disclosed outside the study without the written permission of the participant.

Declaration of interests 28 Financial and other competing interests for principal investigators for the overall trial and each study site: None.

Access to data 29 Only the principal investigator will have an access to the data set. The data will be protected by a password. For confidentiality reasons, the data disseminated to the other investigators of the study will be devoid of any information that could identify the participants.

Ancillary and post-trial care 30 Provisions, if any, for ancillary and post-trial care, and for compensation to those who suffer harm from trial participation: Not applicable.

- Dissemination policy
- 31a **Final scientific report and end of study :**  
 The ORAMICAL study will end at the planned end date of 36 months after the inclusion of the last participant, or at an earlier or later date if the circumstances justify it. At the end of the trial, the sponsor must inform the PPC (Protection of Persons Committee) of the end of the research (date of inclusion of the last patient) within 90 days.  
 The principal investigator must write the final scientific report of the project, which must include the results and the clinical impact of the study. The investigator will be invited to present these results to the Scientific Committee of the Nice University Hospital.  
 A summary of the final report must be sent to the ANSM within one year of the end of the research.  
 Furthermore, at the end of the trial, the sponsor must close the trial and inform the associated centres and the PPC. According to the Law of 09 August 2004, patients can ask the investigator for a summary of the overall results of the research.  
**Publication:**  
 Any publication or communication must comply with the rules established by the sponsor, mention the sponsor of the study, i.e. the Nice University Hospital, and the source of funding. In this respect, the investigator must send a copy of these communications and/or publications to the DRCl.  
 Each article or abstract will be written in agreement with all the investigators or the non-editing investigators will have to give their opinion concerning the relevance and scientific merit of the article. All investigators must agree before submission.  
 Papers may be on primary outcomes. The decision as to whether or not an analysis represents a primary outcome will be made by all investigators.  
 All papers and abstracts on data other than those considered to be primary outcomes must also be approved by all investigators before submission.
- 31b Authorship eligibility guidelines and any intended use of professional writers: None.
- 31c Plans, if any, for granting public access to the full protocol, participant-level dataset, and statistical code: None.

## Appendices

Informed consent 32  
materials

**INFORMED CONSENT TO THE STORAGE OF BIOLOGICAL AND TISSUE  
SAMPLES AND THE USE OF PERSONAL DATA RENDERED NON-  
NOMINATIVE BY THE LEGAL REPRESENTATIVE/GUARDIAN for his/her  
relative OR THE PATIENT**

Je soussigné(e),

Name ..... First name .....

Date of birth : \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

Acting, where applicable, in the capacity of:

For the patient :

Name ..... First name .....

Date of birth : \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

Following the reading today of the information contained in the attached note and the explanations given by the doctor, in particular on :

- The realization of oral samples (saliva and dental plaque) in the Odontology pole (University Hospital of Nice) and their conservation for "archiving" in the laboratory MICORALIS of the Faculty of Dental Surgery of Nice,
- The production of cell cultures from these samples to create a frozen biobank,
- The use of these samples for research purposes,
- The constitution of a medical database including some of his clinical data made non-nominative which could be made available to clinicians and researchers,
- The various rights related to the processing of his personal data.

Doctor..... explained to me the nature of the possible studies that could, in the future, be carried out on the samples taken and kept by the teams of the Côte d'Azur University, the Nice University Hospital (INSERM /CNRS), the Antoine Lacassagne Centre, or other national or international teams and possibly by industrialists, and the fact that they will use cellular and molecular biology techniques, that they may extend over several years and that my biological samples/those of my relative will be kept in this sense for a period of 20 years, tacitly renewable from the date of their collection.

I have also been informed that the creation of this collection does not entail any risk for me/my relative, that it is of no direct benefit to me/my relative, but will allow for better treatment of patients in the future.

I have been informed that certain data made non-nominative concerning me/them will be subject to computerised processing, in compliance with the French Data Protection Act n°78-17 of 6 January 1978, amended on 20 June 2018, and thus with Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the Council of 27 April 2016, applicable as of 25 May 2018 (General Data Protection Regulation). I have been informed of the various rights I have concerning myself/my relative for this computerised processing.

I GIVE MY CONSENT FOR THE USE OF THESE BIOLOGICAL SAMPLES FOR SCIENTIFIC RESEARCH PURPOSES. I AGREE THAT THE NON-IDENTIFYING MEDICAL DATA COLLECTED AND ASSOCIATED WITH THE SAMPLES MAY BE PROCESSED AND DISSEMINATED FOR RESEARCH PROJECTS.

I know that my decision is revocable, and that in the event of a change of decision on my part, I may request the destruction of the samples which are still kept in the MICORALIS Laboratory only for scientific reasons as well as the associated medical data.

In.....on .....

Practitioner's signature

Signature of patient/legal representative  
preceded by the words "read and approved"

Biological specimens                      33 Plans for collection, laboratory evaluation, and storage of biological specimens for genetic or molecular analysis in the current trial and for future use in ancillary studies, if applicable: Not applicable.

---

The SPIRIT checklist is copyrighted by the SPIRIT Group under the Creative Commons [“Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported”](#) license.

## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Comme cela a été discuté dans les parties précédentes, l'implication du microbiote oral et parodontal dans le développement de la MA dispose d'un faisceau d'arguments de plus en plus étoffé.

Cependant la force de ce lien ainsi qu'une causalité potentielle représentent autant de lacunes encore à combler.

Nous avons souhaité effectuer un état des lieux succinct des connaissances et lacunes en lien avec le sujet, en y intégrant les résultats de notre étude, et proposerons quelques pistes de recherche en rapport.

### A. Données des études in vitro et chez l'animal

Des études en laboratoire ont révélé que l'infection par *Pg*, agent pathogène clé de la parodontite chronique chez l'homme, entraînait chez la souris entraîne une colonisation du cerveau et une augmentation de la production de plaque amyloïde, particulièrement celle de Dominy et al. (79).

Un autre étude récente in vitro (187), s'est quant à elle intéressée au virus EBV et permis d'identifier les miARN cibles de l'EBV et leurs gènes régulés, les gènes liés à la SEP, une autre maladie inflammatoire chronique du système nerveux central, ainsi que les voies de risque, ce qui pourrait fournir un nouvel aperçu de la découverte de biomarqueurs diagnostiques et de cibles thérapeutiques pour la SEP.

L'association entre la co-infection herpétique/bactérienne et les maladies parodontales ont aussi été décrite, comme pour *Pg* et CMV ou *Aa* et HSV-1. Une étude in vitro (160) a ainsi souhaité étudier les effets de la co-infection de certaines bactéries buccales sur les cellules épithéliales buccales infectées par le virus herpès simplex de type 1 (HSV- 1) et a montré que *Aa* a augmentait le rendement du HSV-1, cette co-infection pouvant profiter soit au HSV-1 soit à *Aa*. Ces résultats font écho à des études cliniques antérieures montrant la co-infection du HSV et de *Aa* chez des patients atteints de parodontite agressive.

### B. Données des études sur échantillons de cerveaux post-mortem

Des agents pathogènes parodontaux majeurs ont été détectés dans les lésions cérébrales de patients décédés et atteints de MA, suggérant une connexion infectieuse et inflammatoire entre la sphère oropharyngée et le cerveau. Ce lien pourrait notamment s'expliquer par la diffusion d'agents infectieux, ou inflammatoires, migrant depuis la cavité orale vers le cerveau (11,14,15,16).

Il est aujourd'hui bien établi que la neuroinflammation, due à l'activation des cellules immunitaires du cerveau, joue un rôle majeur dans la progression de la MA. Les causes de cette neuroinflammation restent encore mal connues, cependant les résultats de plusieurs études suggèrent de plusieurs agents pathogènes, incluant des virus et des bactéries, pourraient être des « inducteurs » à l'origine de l'inflammation neuronale (18). En particulier, des travaux récents mettent en évidence la présence d'agents infectieux oraux dans les tissus lésionnels du cerveau de patients décédés de la MA (19).



L'incursion microbiologique dans le système nerveux central (SNC) pourrait s'effectuer soit via la voie orale-nasale- olfactive soit par le biais des leucocytes circulants. Avec une densité sept fois plus élevée chez des patients décédés et atteints de MA par rapport à des patients non atteints, les bactéries les plus fréquemment retrouvées dans les lésions cérébrales sont majoritairement des bactéries orales (20).

*Pg* et ses LPS ont récemment été retrouvés dans le cerveau et le liquide cébrospinal de patients décédés de la MA (79,80). *Pg* aurait en effet la capacité de détourner le système immunitaire pour circuler jusqu'au cerveau et de traverser la barrière hémato encéphalique (78), d'autant que celle-ci apparaît déficiente chez les patients âgés et particulièrement chez ceux atteints de la MA. Les bactéries présentes dans le sang peuvent alors pénétrer dans l'encéphale ce qui influencerait la progression de la MA (72,78). À ce jour, les bactéries orales les plus souvent retrouvées dans le SNC et associées aux troubles cognitifs sont des Spirochetes telles que des Treponèmes ou *Borrelia burgdorferi* (98), *Pg* (83,98), *Fn* et *Prevotella intermedia* (83). *Pg*, l'agent pathogène clé de la parodontite chronique est significativement identifié dans le cerveau des patients décédés de MA. La présence de hauts niveaux de IgG anti-*Pg* ont été mis en évidence (13), impliquant une plus grande possibilité de déficit cognitif et de mémoire (99,100). HHV-6 et HSV-1 sont des HHV retrouvés dans la cavité buccale et neurotropes. Ils sont fréquemment retrouvés au niveau cérébral. Des données récentes sont en faveur de leur implication dans la MA, avec une augmentation de l'abondance de HSV-1 et HHV-6A/7 dans le cerveau de patients décédés et atteints de MA (101), et une interaction entre le CMV et le HSV-1 qui serait significativement associée au risque de développement de la MA (102).

le VZV n'a pas été suggéré jusqu'à présent comme une cause prospective de démence. Un argument possible contre son implication est le fait qu'il ne se réactive généralement qu'une fois, alors que des réactivations récurrentes semblent être une condition préalable au développement de la démence, car la progression de la maladie se fait sur plusieurs années (172). Cependant, ces hypothèses demeurent incertaines.

Les données sur la présence du HSV-1 dans une forte proportion de cerveaux de personnes âgées (176) et son association avec l'APOE-ε4 chez les patients atteints de MA (177) soutiennent en revanche fortement un rôle causal du HSV-1 dans la MA. La plupart des patients atteints de la MA, contre très peu de témoins âgés, étaient porteurs de l'allèle APOE-ε4. La présence du HSV-1 dans le cerveau et l'APOE-ε4 ont ainsi été proposés comme un facteur de risque majeur de la MA (177). Si le HHV-6 ne semblait pas être directement associé aux patients atteints de la MA et porteurs de l'APOE-ε4, il pourrait plutôt renforcer les dommages causés par le HSV-1 et l'APOE-ε4 dans la MA (179).

### C. Données des études chez l'homme

Notre revue de la littérature a montré une augmentation de *Fn* chez les patients atteints de MA (p ajusté = 0,02), et son incidence était liée à *Campylobacter rectus* (*Cr*) et *Pg* (HR ajusté = 1,22 (1,04-1,43), p = 0,012) ainsi qu'à *An* (HR brut = 2,0 (1,1-3,8)). La présence d'une parodontite au départ était associée

à une multiplication par six du taux de déclin cognitif sur une période de suivi de 6 mois (changement moyen dans l'échelle d'évaluation cognitive de la MA ou Alzheimer's Disease Assessment Scale (cognition) (ADAS-Cog) de  $2,9 \pm 6,6$ ). La présente revue a ainsi mis en évidence une association entre MA et MA, renforçant l'hypothèse que le traitement de la maladie parodontale pourrait être un moyen de prévenir la MA.

La pathogénie des maladies parodontales est considérée comme un processus à plusieurs étapes impliquant des interactions complexes entre HHV, bactéries, facteurs de l'hôte et facteurs environnementaux modulateurs de la maladie (146,147). La cavité buccale héberge de plus de nombreux HHV (EBV, CMV, HSV-1, HHV-6, -7 et -8), dont certains sont connus pour augmenter la gravité de la maladie chez les patients parodontaux (148). En effet, des études concernant principalement HSV-1, EBV, CMV et HHV-7, ont montré une association significative entre ces derniers et les maladies parodontales (149). EBV et CMV font ainsi partie des herpès virus régulièrement retrouvés associés à la parodontite dans la littérature. En effet, une étude clinique récente (158) a montré un taux de détection de l'EBV et de CMV significativement plus élevés chez les patients atteints de formes sévères de parodontite. De plus en plus de preuves confirment le lien entre les infections herpétiques et la MA. (18,162,163). Les herpès virus, notamment le HSV-1, ainsi que le VZV (164-167), ont été impliqués dans le développement de la MA, bien que ces relations restent controversées.

Dans ce contexte, notre recherche a montré qu' EBV était significativement plus présent chez les patients atteints de MA que chez les témoins ( $p=0,032$ ). Le VZV a également été retrouvé plus fréquemment chez les patients MA ( $p=0,023$ ) et, lorsqu'il était retrouvé, il l'était en plus grande quantité ( $p=0,0012$ ). Cette tendance a également été retrouvée dans une moindre mesure pour EBV ( $p=0,086$ ), le CMV ( $p=0,088$ ) et HHV-7 ( $p=0,06$ ), bien que ces résultats soient à la limite de la significativité, probablement en raison de la petite taille de l'échantillon.

*Pg* est significativement plus présent chez les patients atteints de MA ( $p=0,023$ ) que chez les témoins, et lorsqu'il est présent, en plus grande quantité ( $p=0,0026$ ). *Fn* a également été trouvé en plus grande quantité chez les cas ( $p=0,023$ ), et est également apparu plus présent chez les patients atteints de la MA, sans toutefois atteindre la limite de la significativité ( $p=0,082$ ). Ces données sont cohérentes avec un article récent de revue systématique (12) qui a décrit une augmentation de *Fn* chez les patients atteints de MA et une incidence liée à *Cr*, *Pg* et *An*, suggérant une association entre la maladie parodontale et MA.

#### **D. Perspectives de prévention et de traitement**

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif qui permette de guérir la MA. Un traitement a toutefois reçu une autorisation transitoire de mise sur le marché aux Etats-Unis en juin 2021. Il s'agit de l'Adulhem (aducanumab), qui est le premier du genre à cibler une des causes de la maladie elle-même,

la présence de plaques bêta-amyloïdes dans le cerveau. Pourtant, l'efficacité de ce traitement injectable n'a pas été prouvée, et il reste extrêmement coûteux, aussi d'autres voies de recherche sont d'actualité. Parmi elles, la question de la vaccination, et plus précisément celle contre le virus HZ, reste débattue. Deux études récentes (173,174) se sont penchées sur cette question. Une première étude rétrospective (173) a mis en évidence, en s'appuyant sur l'étude de dossiers médicaux des Veterans Health Affairs âgés de plus de 65 ans et exempts de que la vaccination contre le virus HZ était associée à un risque réduit de démence. Les auteurs expliquent que la vaccination pourrait fournir une neuroprotection non spécifique en entraînant le système immunitaire à limiter l'inflammation dommageable, ou une neuroprotection spécifique qui empêche les effets cytopathiques viraux. Une seconde étude (174) reposant également sur l'étude de données, a fait le constat du fait que la vaccination contre le virus HZ réduirait le risque de démence. Cette étude pose l'hypothèse que la réactivation par les HHV de voies embryonnaires réduites au silence à la naissance comme l'un des processus pathologiques potentiels de la MA.

Les données sur la présence du HSV1 dans une forte proportion de cerveaux de personnes âgées (176) et son association avec l'APOE-ε4 chez les patients atteints de MA (177) soutiennent également la probabilité qu'un traitement antiherpétique puisse être utilisé pour prévenir l'apparition de la maladie ou pour ralentir sa progression.

Si les données récentes vont dans le sens d'un lien MA et MP, une bonne hygiène buccale a toujours été considérée comme un pilier de la santé parodontale. De ce fait, une éducation thérapeutique ainsi que des contrôles cliniques et radiologiques réguliers sont indispensables. Leur fréquence dépendra de multiples facteurs et notamment de l'état de santé du patient, de son hygiène de vie et d'éventuelles prédispositions à développer des maladies parodontales (11). En l'absence de manœuvres d'hygiène bucco-dentaire, qui permettent son élimination régulière, le biofilm fournit, à chaque étape de son développement, un nouvel environnement favorable à la croissance de bactéries responsables de pathologies bucco-dentaires.

La majorité des patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent un niveau élevé de dépendance et sont institutionnalisés, et la plupart d'entre eux ne peuvent pas pratiquer eux-mêmes l'hygiène buccale. Cependant, les soignants ne prêtent souvent pas l'attention nécessaire au maintien de procédures d'hygiène bucco-dentaire efficaces (189,190). Les soignants des maisons de soins et des hôpitaux doivent donc être informés et recevoir des instructions sur la meilleure façon de répondre à ces exigences d'hygiène. Il a en été montré que l'éducation à la santé bucco-dentaire du personnel des maisons de soins améliore ses attitudes et ses connaissances en matière de soins bucco-dentaires (191) et réduit le niveau de plaque dentaire et les infections gingivales et muqueuses associées chez les résidents (192). En outre, il convient de rappeler que le lien entre une mauvaise hygiène bucco-dentaire et l'aggravation des conditions générales de santé chez les personnes âgées a été démontré et mis en évidence par de nombreuses études (193-197).

Dans ce contexte, Il est à souligner que l'amélioration de l'indice de plaque modifie favorablement la composition microbiologique orale (85-87) et pourrait permettre de réduire l'incidence des pathogènes sur la pathologie neuronale. Cela va dans le sens d'une prévention et d'un suivi bucco-dentaire plus systématique chez les personnes âgées, d'autant qu'ils représentent des moyens accessibles pour tenter de réduire l'incidence des troubles neurocognitifs majeurs chez ces populations. Si les marqueurs bucco-dentaires s'avéraient en effet être prédictifs du développement ou de la progression de la MA, le suivi des personnes âgées pourraient être facilités. Ces nouvelles informations pourraient aider les professionnels de la santé bucco-dentaire ainsi que les professionnels de la gériatrie et de la neurodégénérescence dans la prévention et/ou le traitement de la MA.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G-C, Wu Y-T, Matthew P. World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London: Alzheimer's Disease International (ADI); 2015. <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2015.pdf>
2. Ramaroson H, Helmer C, Barberger-Gateau P, Letenneur L. Prévalence de la démence et de la maladie d'Alzheimer chez les personnes de 75 ans et plus : données réactualisées de la cohorte PAQUID. *Revue Neurologique* avril 2003 ; vol.159 n°4. P.405-411 Doi : RN-04-2003-4-159-0035-3787-101019-ART4
3. World Health Organization. Global Burden of Disease 2004 Update: Disability Weights for Diseases and Conditions. Geneva: World Health Organization; 2004.
4. Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and A $\beta$ : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol.* 2020 Oct;140(4):417-447. doi: 10.1007/s00401-020-02196-w. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32728795; PMCID: PMC7498448.
5. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789. PMID: 33302541; PMCID: PMC7764106.
6. A Armstrong R. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2019;57(2):87-105. doi: 10.5114/fn.2019.85929. PMID: 31556570.
7. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, Taylor GW, Page RC, Beck JD, Genco RJ. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol.* 2015 May;86(5):611-22. doi: 10.1902/jop.2015.140520. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25688694; PMCID: PMC4460825.
8. Mohamed HG, Idris SB, Mustafa M, Ahmed MF, Åström AN, Mustafa K, Ibrahim SO. Impact of Chronic Periodontitis on Levels of Glucoregulatory Biomarkers in Gingival Crevicular Fluid of Adults with and without Type 2 Diabetes. *PLoS One.* 2015 May 20;10(5):e0127660. doi: 10.1371/journal.pone.0127660. PMID: 25993052; PMCID: PMC4438982.
9. Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S. Dental Infections and Cardiovascular Diseases: A Review. *J Periodontol.* 2005 Nov;76 Suppl 11S:2085-2088. doi: 10.1902/jop.2005.76.11-S.2085. PMID: 29539055.
10. Han YW, Houcken W, Loos BG, Schenkein HA, Tezal M. Periodontal disease, atherosclerosis, adverse pregnancy outcomes, and head-and-neck cancer. *Adv Dent Res.* 2014 May;26(1):47-55. doi: 10.1177/0022034514528334. PMID: 24736704.
11. Ranjan R, Abhinay A, Mishra M. Can oral microbial infections be a risk factor for neurodegeneration? A review of the literature. *Neurol India.* 2018 Mar-Apr;66(2):344-351. doi: 10.4103/0028-3886.227315. PMID: 29547153.
12. Dioguardi M, Gioia GD, Caloro GA, Capocasale G, Zhurakivska K, Troiano G, Russo LL, Muzio LL. The Association between Tooth Loss and Alzheimer's Disease: a Systematic Review with Meta-Analysis of Case Control Studies. *Dent J (Basel).* 2019 May 1;7(2):49. doi: 10.3390/dj7020049. PMID: 31052367; PMCID: PMC6630622.
13. Dioguardi M, Crincoli V, Laino L, Alovisi M, Sovereto D, Mastrangelo F, Russo LL, Muzio LL. The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer's Disease:

A Systematic Review. *J Clin Med*. 2020 Feb 11;9(2):495. doi: 10.3390/jcm9020495. PMID: 32054121; PMCID: PMC7074205.

15. Olsen I, Singhrao SK. Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? *J Oral Microbiol*. 2015 Sep 17;7:29143. doi: 10.3402/jom.v7.29143. PMID: 26385886; PMCID: PMC4575419.

16. Pritchard AB, Crean S, Olsen I, Singhrao SK. Periodontitis, Microbiomes and their Role in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2017 Oct 24;9:336. doi: 10.3389/fnagi.2017.00336. PMID: 29114218; PMCID: PMC5660720.

17. Pascoal TA, Benedet AL, Ashton NJ, Kang MS, Therriault J, Chamoun M, Savard M, Lussier FZ, Tissot C, Karikari TK, Ottoy J, Mathotaarachchi S, Stevenson J, Massarweh G, Schöll M, de Leon MJ, Soucy JP, Edison P, Blennow K, Zetterberg H, Gauthier S, Rosa-Neto P. Microglial activation and tau propagate jointly across Braak stages. *Nat Med*. 2021 Sep;27(9):1592-1599. doi: 10.1038/s41591-021-01456-w. Epub 2021 Aug 26. Erratum in: *Nat Med*. 2021 Nov;27(11):2048-2049. PMID: 34446931.

18. Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, Ball MJ, Bearer EL, Braak H, Bullido MJ, Carter C, Clerici M, Cosby SL, Del Tredici K, Field H, Fulop T, Grassi C, Griffin WS, Haas J, Hudson AP, Kamer AR, Kell DB, Licastro F, Letenneur L, Lövheim H, Mancuso R, Miklossy J, Otth C, Palamara AT, Perry G, Preston C, Pretorius E, Strandberg T, Tabet N, Taylor-Robinson SD, Whittum-Hudson JA. Microbes and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2016;51(4):979-84. doi: 10.3233/JAD-160152. PMID: 26967229; PMCID: PMC5457904.

19. Lövheim H, Olsson J, Weidung B, Johansson A, Eriksson S, Hallmans G, Elgh F. Interaction between Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Type 1 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease Development. *J Alzheimers Dis*. 2018;61(3):939-945. doi: 10.3233/JAD-161305. PMID: 29254081.

20. Miklossy J, McGeer PL. Common mechanisms involved in Alzheimer's disease and type 2 diabetes: a key role of chronic bacterial infection and inflammation. *Aging (Albany NY)*. 2016 Apr;8(4):575-88. doi: 10.18632/aging.100921. PMID: 26961231; PMCID: PMC4925815.

21. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102. Epub 2005 Jul 20. PMID: 16033867; PMCID: PMC1176910.

22. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):55-60. doi: 10.1038/nature11450. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23023125.

23. Defina PA, Moser RS, Glenn M, Lichtenstein JD, Fellus J. Alzheimer's disease clinical and research update for health care practitioners. *J Aging Res*. 2013;2013:207178. doi: 10.1155/2013/207178. Epub 2013 Sep 4. PMID: 24083026; PMCID: PMC3776389.

24. Vellas B., Robert P. *Traité sur la maladie d'Alzheimer*. Paris: Springer Paris, 2013. doi: 10.1007/978-2-8178-0443-9.

25. B. Balin BJ, Hudson AP. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014 Mar;14(3):417. doi: 10.1007/s11882-013-0417-1. PMID: 24429902.

26. H. Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurologia*. 2017 Oct;32(8):523-532. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2016.02.016. Epub 2016 Apr 26. PMID: 27130306.
27. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2020 Mar 10. doi: 10.1002/alz.12068. Epub ahead of print. PMID: 32157811.
28. A. D. International and C. Patterson, « World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: New frontiers », sept. 2018, Consulté le: mars 13, 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2018/>
29. Chêne G, Beiser A, Au R, Preis SR, Wolf PA, Dufouil C, Seshadri S. Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimers Dement*. 2015 Mar;11(3):310-320. doi: 10.1016/j.jalz.2013.10.005. Epub 2014 Jan 10. PMID: 24418058; PMCID: PMC4092061.
30. Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am*. 2019 Mar;103(2):263-293. doi: 10.1016/j.mcna.2018.10.009. PMID: 30704681.
31. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*. 2018 Jul 31;7:F1000 Faculty Rev-1161. doi: 10.12688/f1000research.14506.1. PMID: 30135715; PMCID: PMC6073093.
32. W. H. Organization, *ICD-10 : international statistical classification of diseases and related health problems : tenth revision*. World Health Organization, 2004. Consulté le: mai 12, 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42980>
33. ICD-11 - ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics » <https://icd.who.int/browse11/l-m/en> (consulté le mars 12, 2022).
34. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984 Jul;34(7):939-44. doi: 10.1212/wnl.34.7.939. PMID: 6610841.
35. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed.; American Psychiatric Publishing: Arlington, VA, 2013; pp. 5-25.
36. Creavin ST, Wisniewski S, Noel-Storr AH, Trevelyan CM, Hampton T, Rayment D, Thom VM, Nash KJ, Elhamoui H, Milligan R, Patel AS, Tsivos DV, Wing T, Phillips E, Kellman SM, Shackleton HL, Singleton GF, Neale BE, Watton ME, Cullum S. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of dementia in clinically unevaluated people aged 65 and over in community and primary care populations. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jan 13;2016(1):CD011145. doi: 10.1002/14651858.CD011145.pub2. PMID: 26760674; PMCID: PMC8812342.
37. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011 May;7(3):263-9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21514250; PMCID: PMC3312024.
38. Haute Autorité de Santé - Médicaments de la maladie d'Alzheimer : un intérêt médical insuffisant pour justifier leur prise en charge par la solidarité nationale. <https://www.has->

sante.fr/jcms/c\_2679466/fr/medicaments-de-la-maladie-d-alzheimer- un-interet-medical-insuffisant-pour-justifier-leur-prise-en-charge-par-la-solidarite- nationale (consulté le mars 11, 2022).

39. Bahar-Fuchs A, Martyr A, Goh AM, Sabates J, Clare L. Cognitive training for people with mild to moderate dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar 25;3(3):CD013069. doi: 10.1002/14651858.CD013069.pub2. PMID: 30909318; PMCID: PMC6433473.

40. Gaur S, Agnihotri R. Alzheimer's disease and chronic periodontitis: is there an association? *Geriatr Gerontol Int.* 2015 Apr;15(4):391-404. doi: 10.1111/ggi.12425. Epub 2014 Dec 16. PMID: 25511390.

41. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1121-9. doi: 10.1172/JCI25100. PMID: 15864339; PMCID: PMC1087184.

42. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 2006;40:29-49. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00140.x. PMID: 16398684.

43. Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, Nitta H, Nishihara T. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997 Jun;14:79-111. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00193.x. PMID: 9567967.

44. Wolf HF, Rateitschak KH, Rateitschak EM. *Parodontologie*, Elsevier-Masson, 2005

45. Pizzo G, Guiglia R, Lo Russo L, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *Eur J Intern Med.* 2010 Dec;21(6):496-502. doi: 10.1016/j.ejim.2010.07.011. PMID: 21111933.

46. Santé bucco dentaire. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/oral-health> (consulté le mars 12, 2022).

47. Singhrao SK, Harding A, Simmons T, Robinson S, Kesavalu L, Crean S. Oral inflammation, tooth loss, risk factors, and association with progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;42(3):723-37. doi: 10.3233/JAD-140387. PMID: 24946875.

48. Tonetti MS, Claffey N; European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:210-3. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00822.x. PMID: 16128839.

49. Société Française de Parodontologie et d'implantologie orale - La nouvelle classification des maladies et affections parodontales et péri-implantaires. <https://www.sfpio.com/informations-praticiens/la-nouvelle-classification-des-maladies-et-affections-parodontales-et-peri-implantaires.html> (consulté le mars 13, 2022).

50. Mishra R, Chandrashekar KT, Tripathi VD, Trivedi A, Daryani H, Hazari A. Analysis of curtailing prevalence estimates of periodontitis post the new classification scheme: A cross-sectional study. *J Indian Soc Periodontol.* 2019 Nov-Dec;23(6):569-573. doi: 10.4103/jisp.jisp\_57\_19. PMID: 31849404; PMCID: PMC6906900.

51. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2013 Jun;62(1):59-94. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x. PMID: 23574464.



52. Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res*. 2005 Dec;84(12):1154-9. doi: 10.1177/154405910508401212. PMID: 16304446; PMCID: PMC1797067.
53. Beck JD, Koch GG, Zambon JJ, Genco RJ, Tudor GE. Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *J Periodontol*. 1992 Feb;63(2):93-9. doi: 10.1902/jop.1992.63.2.93. PMID: 1313107.
54. Turnbull B. Smoking and periodontal disease. A review. *J N Z Soc Periodontol*. 1995;(79):10-5. PMID: 9227092.
55. Mealey BL, Rose LF. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Compend Contin Educ Dent*. 2008 Sep;29(7):402-8, 410, 412-3. PMID: 18795634.
56. Jones JA, Miller DR, Wehler CJ, Rich SE, Krall-Kaye EA, McCoy LC, Christiansen CL, Rothendler JA, Garcia RI. Does periodontal care improve glycemic control? The Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. *J Clin Periodontol*. 2007 Jan;34(1):46-52. doi: 10.1111/j.1600-051X.2006.01002.x. Epub 2006 Nov 24. PMID: 17137468.
57. Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, Bürgin W, Brägger U, Buser D, Duff GW, Kornman KS. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Feb;14(1):10-7. doi: 10.1034/j.1600-0501.2003.140102.x. PMID: 12562360.
58. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1. PMID: 10863370.
59. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935. PMID: 29926489.
60. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S9-S16. doi: 10.1111/jcpe.12936. PMID: 29926485.
61. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S17-S27. doi: 10.1111/jcpe.12937. PMID: 29926503.
62. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S28-S43. doi: 10.1111/jcpe.12938. PMID: 29926497.
63. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdani A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdani M, Tebyanian H. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Nov;38(11):2005-2019. doi: 10.1007/s10096-019-03641-9. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31372904.
64. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:12-32. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00190.x. PMID: 9567964.
65. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5721-32. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005. PMID: 16272510; PMCID: PMC1287824.
66. Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. *Periodontol 2000*. 2010 Feb;52(1):38-52. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00311.x. PMID: 20017794; PMCID: PMC3665295.

67. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001 Jun;183(12):3770-83. doi: 10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001. PMID: 11371542; PMCID: PMC95255.
68. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):134-44. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x. PMID: 9495612.
69. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38:135-87. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x. PMID: 15853940.
70. Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol.* 2014 Feb;44(2):328-38. doi: 10.1002/eji.201344202. PMID: 24338806; PMCID: PMC3925422.
71. Hajishengallis G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Biosci.* 2011;53(3):233-240. doi: 10.2330/joralbiosci.53.233. PMID: 22162663; PMCID: PMC3231999.
72. Singhrao SK, Olsen I. Are *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Microbullets for Sporadic Alzheimer's Disease Manifestation? *J Alzheimers Dis Rep.* 2018 Dec 20;2(1):219-228. doi: 10.3233/ADR-180080. PMID: 30599043; PMCID: PMC6311351.
73. Teles FR, Teles RP, Uzel NG, Song XQ, Torresyap G, Socransky SS, Haffajee AD. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodontol Res.* 2012 Feb;47(1):95-104. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01409.x. Epub 2011 Sep 5. PMID: 21895662; PMCID: PMC3253172.
74. Teixeira FB, Saito MT, Matheus FC, Prediger RD, Yamada ES, Maia CSF, Lima RR. Periodontitis and Alzheimer's Disease: A Possible Comorbidity between Oral Chronic Inflammatory Condition and Neuroinflammation. *Front Aging Neurosci.* 2017 Oct 10;9:327. doi: 10.3389/fnagi.2017.00327. PMID: 29085294; PMCID: PMC5649154.
75. Axelsson P, Lindhe J. The significance of maintenance care in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1981 Aug;8(4):281-94. doi: 10.1111/j.1600-051x.1981.tb02039.x. PMID: 6947992.
76. Reners M. *La parodontologie tout simplement*, Editions Espace id. 2018.
77. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontol 2000.* 2013 Jun;62(1):218-31. doi: 10.1111/prd.12008. PMID: 23574468.
78. Singhrao SK, Harding A. Is Alzheimer's disease a polymicrobial host microbiome dysbiosis? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2020 Apr;18(4):275-277. doi: 10.1080/14787210.2020.1729741. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32048530.
79. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U, Raha D, Griffin C, Holsinger LJ, Arastu-Kapur S, Kaba S, Lee A, Ryder MI, Potempa B, Mydel P, Hellvard A, Adamowicz K, Hasturk H, Walker GD, Reynolds EC, Faull RLM, Curtis MA, Dragunow M, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* 2019 Jan 23;5(1):eaau3333. doi: 10.1126/sciadv.aau3333. PMID: 30746447; PMCID: PMC6357742.

80. Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis.* 2013;36(4):665-77. doi: 10.3233/JAD-121918. PMID: 23666172.
81. Leblhuber F, Huemer J, Steiner K, Gostner JM, Fuchs D. Knock-on effect of periodontitis to the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Wien Klin Wochenschr.* 2020 Sep;132(17-18):493-498. doi: 10.1007/s00508-020-01638-5. Epub 2020 Mar 25. Erratum in: *Wien Klin Wochenschr.* 2020 Apr 6;; PMID: 32215721; PMCID: PMC7519001.
82. Martande SS, Pradeep AR, Singh SP, Kumari M, Suke DK, Raju AP, Naik SB, Singh P, Guruprasad CN, Chatterji A. Periodontal health condition in patients with Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2014 Sep;29(6):498-502. doi: 10.1177/1533317514549650. PMID: 25214647.
83. Sparks Stein P, Steffen MJ, Smith C, Jicha G, Ebersole JL, Abner E, Dawson D 3rd. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2012 May;8(3):196-203. doi: 10.1016/j.jalz.2011.04.006. PMID: 22546352; PMCID: PMC3712346.
84. Gil-Montoya JA, Sanchez-Lara I, Carnero-Pardo C, Fornieles F, Montes J, Vilchez R, Burgos JS, Gonzalez-Moles MA, Barrios R, Bravo M. Is periodontitis a risk factor for cognitive impairment and dementia? A case-control study. *J Periodontol.* 2015 Feb;86(2):244-53. doi: 10.1902/jop.2014.140340. Epub 2014 Oct 27. PMID: 25345338.
85. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Løe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res.* 1966;1:1-13. doi: 10.1111/j.1600-0765.1966.tb01842.x. PMID: 4224181.
86. Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 1967 Dec;12(12):1561-8. doi: 10.1016/0003-9969(67)90190-2. PMID: 5237337.
87. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* 1995 Sep;15(3):169-75. doi: 10.1007/BF01569822. PMID: 8519474.
88. Perrone D, Ardito F, Giannatempo G, Dioguardi M, Troiano G, Lo Russo L, DE Lillo A, Laino L, Lo Muzio L. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *Exp Ther Med.* 2015 Nov;10(5):1615-1623. doi: 10.3892/etm.2015.2749. Epub 2015 Sep 17. PMID: 26640527; PMCID: PMC4665301.
89. Santé bucco-dentaire. Aide-mémoire N° 318, février 2007, Organisation Mondiale de la Santé, Genève.
90. Oral Health in America: A Report of the Surgeon General. Executive Summary. Chapter 1: The meaning of oral health. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Service. National Institute of Dental and Craniofacial Research. National Institutes of Health.2000, (p. 17 trad. JP). [www.nidcr.nih.gov/DataStatistics/SurgeonGeneral/sgr/chap1.htm](http://www.nidcr.nih.gov/DataStatistics/SurgeonGeneral/sgr/chap1.htm) ((consulté le mars 13, 2022).
91. Healthy mouth, Healthy lives. Australia's National Oral Health Plan 2004-2013, 2004, (p. 4, trad. JP)
92. Reisine S, Locker D, Social, psychological, and economic impacts of oral conditions and treatments. in Cohen L. K., Gift H. C. eds, *Disease Prevention and Oral Health Promotion, Socio-Dental Sciences in Action.* Munksgaard, Copenhagen, 1995, (p. 38, trad. JP).
93. Dolan TA. Identification of appropriate outcomes for an aging population. *Spec Care Dentist.* 1993 Jan-Feb;13(1):35-9. doi: 10.1111/j.1754-4505.1993.tb01451.x. PMID: 8362338.

94. Mémoire de l' Association Dentaire Canadienne, présenté à la Commission sur l'avenir des soins de santé au Canada, 2001.
95. Bérenholc S., Pourquoi un Comité d'Éthique pour la médecine dentaire ? et pourquoi pas ? in Pirnay Ph. ed., L'éthique en médecine bucco-dentaire. Espace ID, 2012, pp. 18-19.
96. Préambule à la Constitution de l'Organisation mondiale de la Santé, tel qu'adopté par la Conférence internationale sur la Santé, New York, 19-22 juin 1946 ; signé le 22 juillet 1946 par les représentants de 61 États. 1946 (Actes officiels de l'Organisation mondiale de la Santé, n° 2, p. 100) et entré en vigueur le 7 avril 1948
97. Reissmann DR, John MT, Schierz O, Kriston L, Hinz A. Association between perceived oral and general health. *J Dent.* 2013 Jul;41(7):581-9. doi: 10.1016/j.jdent.2013.05.007. Epub 2013 May 21. PMID: 23707644.
98. Miklossy J. Historic evidence to support a causal relationship between spirochetal infections and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2015 Apr 16;7:46. doi: 10.3389/fnagi.2015.00046. PMID: 25932012; PMCID: PMC4399390.
99. Stewart R, Sabbah W, Tsakos G, D'Aiuto F, Watt RG. Oral health and cognitive function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Psychosom Med.* 2008 Oct;70(8):936-41. doi: 10.1097/PSY.0b013e3181870aec. Epub 2008 Oct 8. PMID: 18842752.
100. Chen CK, Wu YT, Chang YC. Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study. *Alzheimers Res Ther.* 2017 Aug 8;9(1):56. doi: 10.1186/s13195-017-0282-6. PMID: 28784164; PMCID: PMC5547465.
101. Hogestyn JM, Mock DJ, Mayer-Proschel M. Contributions of neurotropic human herpesviruses herpes simplex virus 1 and human herpesvirus 6 to neurodegenerative disease pathology. *Neural Regen Res.* 2018 Feb;13(2):211-221. doi: 10.4103/1673-5374.226380. PMID: 29557362; PMCID: PMC5879884.
102. Lövheim H, Olsson J, Weidung B, Johansson A, Eriksson S, Hallmans G, Elgh F. Interaction between Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Type 1 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease Development. *J Alzheimers Dis.* 2018;61(3):939-945. doi: 10.3233/JAD-161305. PMID: 29254081.
103. Tzeng NS, Chung CH, Lin FH, Chiang CP, Yeh CB, Huang SY, Lu RB, Chang HA, Kao YC, Yeh HW, Chiang WS, Chou YC, Tsao CH, Wu YF, Chien WC. Anti-herpetic Medications and Reduced Risk of Dementia in Patients with Herpes Simplex Virus Infections-a Nationwide, Population-Based Cohort Study in Taiwan. *Neurotherapeutics.* 2018 Apr;15(2):417-429. doi: 10.1007/s13311-018-0611-x. PMID: 29488144; PMCID: PMC5935641.
104. Liu XX, Jiao B, Liao XX, Guo LN, Yuan ZH, Wang X, Xiao XW, Zhang XY, Tang BS, Shen L. Analysis of Salivary Microbiome in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2019;72(2):633-640. doi: 10.3233/JAD-190587. PMID: 31594229.
105. Okamoto N, Morikawa M, Okamoto K, Habu N, Hazaki K, Harano A, Iwamoto J, Tomioka K, Saeki K, Kurumatani N. Tooth loss is associated with mild memory impairment in the elderly: the Fujiwara-kyo study. *Brain Res.* 2010 Aug 19;1349:68-75. doi: 10.1016/j.brainres.2010.06.054. Epub 2010 Jul 1. PMID: 20599812.

106. Syrjälä AM, Ylöstalo P, Ruoppi P, Komulainen K, Hartikainen S, Sulkava R, Knuutila M. Dementia and oral health among subjects aged 75 years or older. *Gerodontology*. 2012 Mar;29(1):36-42. doi: 10.1111/j.1741-2358.2010.00396.x. Epub 2010 Jun 30. PMID: 20604811.
107. Shen XN, Niu LD, Wang YJ, Cao XP, Liu Q, Tan L, Zhang C, Yu JT. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis and systematic review of 170 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019 May;90(5):590-598. doi: 10.1136/jnnp-2018-319148. Epub 2019 Jan 10. PMID: 30630955.
108. International Committee on Taxonomy of Viruses [Internet]. Disponible sur: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>(consulté le mars 13, 2022).
109. Espace Etudiant  
Module "Santé et environnement-Maladies transmissibles" LES VIRUS DU GROUPE HERPESVIRIDÆ (consulté le mars 13, 2022).
110. Looker KJ, Garnett GP. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex Transm Infect*. 2005 Apr;81(2):103-7. doi: 10.1136/sti.2004.012039. PMID: 15800084; PMCID: PMC1764655.
111. Infections à herpès virus de l'enfant et de l'adulte immunocompétents: herpès cutané et muqueux. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*. 2008. p. F18-24.
112. Pilly Etudiant. *Infections à Herpès virus du sujet immunocompétent*. Edition 2021.
113. Bünzli D, Wietlisbach V, Barazzoni F, Sahli R, Meylan PR. Seroepidemiology of Herpes Simplex virus type 1 and 2 in Western and Southern Switzerland in adults aged 25-74 in 1992-93: a population-based study. *BMC Infect Dis*. 2004 Mar 17;4:10. doi: 10.1186/1471-2334-4-10. PMID: 15113449; PMCID: PMC395830.
114. Heininger U, Seward JF. Varicella. *Lancet*. 2006 Oct 14;368(9544):1365-76. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69561-5. Erratum in: *Lancet*. 2007 Feb 17;369(9561):558. PMID: 17046469.
115. Choo PW, Donahue JG, Manson JE, Platt R. The epidemiology of varicella and its complications. *J Infect Dis*. 1995 Sep;172(3):706-12. doi: 10.1093/infdis/172.3.706. PMID: 7658062.
116. Meylan P, Kempf W, Gerber S, . Recommandations suisses pour la prise en charge des infections dues au virus de la varicelle-zoster. *Forum Med Suisse* 2007;7:895–905.
117. Perronne C, Lazanas M, Leport C, Simon F, Salmon D, Dallot A, Vildé JL. Varicella in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Arch Dermatol*. 1990 Aug;126(8):1033-6. PMID: 2166482.
118. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Jan;10(1):86-124. doi: 10.1128/CMR.10.1.86. PMID: 8993860; PMCID: PMC172945.
119. Reusser P. Management of viral infections in immunocompromised cancer patients. *Swiss Med Wkly*. 2002 Jul 13;132(27-28):374-8. PMID: 12428191.
120. Becerra JC, Sieber R, Martinetti G, Costa ST, Meylan P, Bernasconi E. Infection of the central nervous system caused by varicella zoster virus reactivation: a retrospective case series study. *Int J Infect Dis*. 2013 Jul;17(7):e529-34. doi: 10.1016/j.ijid.2013.01.031. Epub 2013 Apr 6. PMID: 23566589.

121. Nagel MA, Gilden D. Neurological complications of varicella zoster virus reactivation. *Curr Opin Neurol.* 2014 Jun;27(3):356-60. doi: 10.1097/WCO.0000000000000092. PMID: 24792344; PMCID: PMC4189810.
122. Seigneurin J.M. *Infections à virus Epstein-Barr*, Encyclopédie Médico-Chirurgicale 2001, Maladies Infectieuses, 8-070-K10-. 12 p.
123. Niederman JC, Miller G, Pearson HA, Pagano JS, Dowaliby JM. Infectious mononucleosis. Epstein-Barr-virus shedding in saliva and the oropharynx. *N Engl J Med.* 1976 Jun 17;294(25):1355-9. doi: 10.1056/NEJM197606172942501. PMID: 177872.
124. Tattevin P, Crémieux AC, Descamps D, Carbon C. Transfusion-related infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(10):777-8. doi: 10.1080/00365540260348626. PMID: 12477336.
125. Gratama JW, Oosterveer MA, Zwaan FE, Lepoutre J, Klein G, Ernberg I. Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Nov;85(22):8693-6. doi: 10.1073/pnas.85.22.8693. PMID: 2847171; PMCID: PMC282526.
126. Meyohas MC, Maréchal V, Desire N, Bouillie J, Frottier J, Nicolas JC. Study of mother-to-child Epstein-Barr virus transmission by means of nested PCRs. *J Virol.* 1996 Oct;70(10):6816-9. doi: 10.1128/JVI.70.10.6816-6819.1996. PMID: 8794321; PMCID: PMC190727.
127. Junker AK, Thomas EE, Radcliffe A, Forsyth RB, Davidson AG, Rymo L. Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci.* 1991 Oct;302(4):220-3. doi: 10.1097/00000441-199110000-00005. PMID: 1656752.
128. Epstein MA, Crawford DH. Epstein-Barr virus. In : Mahy BW, Collier L eds. *Virology*. London: Arnold, 1998:351-366.
129. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields BK, Knipe DH, Howley P eds. *Virology*. Philadelphia: JB Lippincott, 1996: 2397-2446.
130. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* 2004 Dec;4(12):725-38. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01202-2. PMID: 15567122.
131. Bresson JL, Clavequin MC, Mazon MC, Mengelle C, Scieux C, Segondy M, Houhou N; Fédération Française des CECOS. Risk of cytomegalovirus transmission by cryopreserved semen: a study of 635 semen samples from 231 donors. *Hum Reprod.* 2003 Sep;18(9):1881-6. doi: 10.1093/humrep/deg362. PMID: 12923143.
132. Luo MH, Schwartz PH, Fortunato EA. Neonatal neural progenitor cells and their neuronal and glial cell derivatives are fully permissive for human cytomegalovirus infection. *J Virol.* 2008 Oct;82(20):9994-10007. doi: 10.1128/JVI.00943-08. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18684829; PMCID: PMC2566273.
133. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Human Herpesviruses 6A, 6B, and 7. *Microbiol Spectr.* 2016 Jun;4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0007-2015. PMID: 27337451.
134. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jan;18(1):217-45. doi: 10.1128/CMR.18.1.217-245.2005. PMID: 15653828; PMCID: PMC544175.

135. Fujisaki H, Tanaka-Taya K, Tanabe H, Hara T, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi K. Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children. *J Med Virol*. 1998 Nov;56(3):275-9. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199811)56:3<275::aid-jmv17>3.0.co;2-d. PMID: 9783698.
136. Plancoulaine S, Gessain A. Aspects épidémiologiques de l'herpèsvirus humain 8 (HHV-8) et du sarcome de Kaposi [Epidemiological aspects of human herpesvirus 8 infection and of Kaposi's sarcoma]. *Med Mal Infect*. 2005 May;35(5):314-21. French. doi: 10.1016/j.medmal.2005.02.009. PMID: 15907610.
137. Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T, Celum C, Selke S, Corey L. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med*. 2000 Nov 9;343(19):1369-77. doi: 10.1056/NEJM200011093431904. PMID: 11070101.
138. Janier M, Agbalika F, de La Salmonière P, Lassau F, Lagrange P, Morel P. Human herpesvirus 8 seroprevalence in an STD clinic in Paris: a study of 512 patients. *Sex Transm Dis*. 2002 Nov;29(11):698-702. doi: 10.1097/00007435-200211000-00013. PMID: 12438907.
139. Cannon MJ, Dollard SC, Smith DK, Klein RS, Schuman P, Rich JD, Vlahov D, Pellett PE; HIV Epidemiology Research Study Group. Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 2001 Mar 1;344(9):637-43. doi: 10.1056/NEJM200103013440904. PMID: 11228278.
140. Chen C, Feng P, Slots J. Herpesvirus-bacteria synergistic interaction in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2020 Feb;82(1):42-64. doi: 10.1111/prd.12311. PMID : 31850623.
141. Contreras A, Botero JE, Slots J. Biology and pathogenesis of cytomegalovirus in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014 Feb;64(1):40-56. doi: 10.1111/j.1600- 0757.2012.00448.x. PMID: 24320955.
140. Raybaud H, Olivieri CV, Lupi-Pegurier L, Pagnotta S, Marsault R, Cardot-Leccia N, Doglio A. Epstein-Barr Virus-Infected Plasma Cells Infiltrate Erosive Oral Lichen Planus. *J Dent Res*. 2018 Dec;97(13):1494-1500. doi: 10.1177/0022034518788282. Epub 2018 Jul 13. PMID: 30004820.
141. Vincent-Bugnas S, Vitale S, Mouline CC, Khaali W, Charbit Y, Mahler P, Prêcheur I, Hofman P, Maryanski JL, Doglio A. EBV infection is common in gingival epithelial cells of the periodontium and worsens during chronic periodontitis. *PLoS One*. 2013 Dec 19;8(12):e80336. doi: 10.1371/journal.pone.0080336. eCollection 2013. PMID: 24367478.
142. Tonoyan L, Vincent-Bugnas S, Olivieri CV, Doglio A. New Viral Facets in Oral Diseases: The EBV Paradox. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 22;20(23):5861. doi: 10.3390/ijms20235861. PMID: 31766729; PMCID: PMC6929135.
143. Olivieri CV, Raybaud H, Tonoyan L, Abid S, Marsault R, Chevalier M, Doglio A, Vincent-Bugnas S. Epstein-Barr virus-infected plasma cells in periodontitis lesions. *Microb Pathog*. 2020 Jun;143:104128. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104128. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32165332.
144. Agostini S, Mancuso R, Costa AS, Citterio LA, Guerini FR, Meloni M, Navarro J, Clerici M. A Possible Role for HSV-1-Specific Humoral Response and PILRA rs1859788 Polymorphism in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jun 22; 9(7):686. doi: 10.3390/vaccines9070686. PMID: 34206597.

145. Carbone I, Lazzarotto T, Ianni M, Porcellini E, Forti P, Masliah E, Gabrielli L, Licastro F. Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Jan; 35(1):122-9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.024. Epub 2013 Aug 3. PMID: 23916950.
146. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994 Jun;5:78-111. doi: 10.1111/j.1600-0757.1994.tb00020.x. PMID: 9673164.
147. Slots J, Contreras A. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Oct;15(5):277-80. doi: 10.1034/j.1399-302x.2000.150501.x. PMID: 11154416.
148. Abooj J, Varma SA. Prevalence of herpes virus in chronic periodontitis patients with and without type 2 diabetes mellitus: A clinico-microbiological study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2021 Jan-Apr;25(1):141-146. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_154\_20. Epub 2021 May 14. PMID: 34349425; PMCID: PMC8272489.
149. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontol Res*. 2000 Feb;35(1):3-16. doi: 10.1034/j.1600-0765.2000.035001003.x. PMID: 10791704.
150. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S28-S43. doi: 10.1111/jcpe.12938. PMID: 29926497.
151. Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL, Slots J. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol*. 1999 May;70(5):478-84. doi: 10.1902/jop.1999.70.5.478. PMID: 10368051.
152. Contreras A, Zadeh HH, Nowzari H, Slots J. Herpesvirus infection of inflammatory cells in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1999 Aug;14(4):206-12. doi: 10.1034/j.1399-302x.1999.140402.x. PMID: 10551163.
153. Rhissassi M, Benrachadi L, Benzarti N. Etiopathogénie des maladies parodontales. Quelle est la place des virus ? *Rev Odont Stomat* 2004;33:275-283
154. Jain MK, Manjunath KS, Jagadish SN. Unusual oral complications of herpes zoster infection: report of a case and review of literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Nov;110(5):e37-41. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.04.026. Epub 2010 Aug 6. PMID: 20692192.
155. Wright WE, Davis ML, Geffen DB, Martin SE, Nelson MJ, Straus SE. Alveolar bone necrosis and tooth loss. a rare complication associated with herpes zoster infection of the fifth cranial nerve. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983 Jul;56(1):39-46. doi: 10.1016/0030-4220(83)90053-1. PMID: 6576309.
156. Owotade FJ, Ugboko VI, Kolude B. Herpes zoster infection of the maxilla: case report. *J Oral Maxillofac Surg*. 1999 Oct;57(10):1249-51. doi: 10.1016/s0278-2391(99)90497-4. PMID: 10513873.
157. Chopra A, Sivaraman K, Thomas BS. Herpes zoster of gingiva in an older woman: a rare case report. *Gerodontology*. 2017 Jun;34(2):280-283. doi: 10.1111/ger.12246. Epub 2016 Jul 19. PMID: 27435832.
158. Puletic M, Popovic B, Jankovic S, Brajovic G. Detection rates of periodontal bacteria and herpesviruses in different forms of periodontal disease. *Microbiol Immunol*. 2020 Dec;64(12):815-824. doi: 10.1111/1348-0421.12857. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33107981.



159. Maulani C, Auerkari EI, C Masulili SL, Soeroso Y, Djoko Santoso W, S Kusdhany L. Association between Epstein-Barr virus and periodontitis: A meta-analysis. *PLoS One*. 2021 Oct 7;16(10):e0258109. doi: 10.1371/journal.pone.0258109. PMID: 34618843; PMCID: PMC8496828.
160. Wu CY, Yu ZY, Hsu YC, Hung SL. Enhancing production of herpes simplex virus type 1 in oral epithelial cells by co-infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Formos Med Assoc*. 2022 Feb 7:S0929-6646(22)00043-2. doi: 10.1016/j.jfma.2022.01.023. Epub ahead of print. PMID: 35144835.
161. Nakamura M, Shigeishi H, Cheng-Yih SU, Sugiyama M, Ohta K. Oral human cytomegalovirus prevalence and its relationships with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults: a cross-sectional study. *J Appl Oral Sci*. 2020 Dec 18;28:e20200501. doi: 10.1590/1678-7757-2020-00501. PMID: 33331391; PMCID: PMC7793530.
162. Harris SA, Harris EA. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;48(2):319-53. doi: 10.3233/JAD-142853. PMID: 26401998; PMCID: PMC4923765.
163. Steel AJ, Eslick GD. Herpes Viruses Increase the Risk of Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*. 2015;47(2):351-64. doi: 10.3233/JAD-140822. PMID: 26401558.
164. Chen VC, Wu SI, Huang KY, Yang YH, Kuo TY, Liang HY, Huang KL, Gossop M. Herpes Zoster and Dementia: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *J Clin Psychiatry*. 2018 Jan/Feb;79(1):16m11312. doi: 10.4088/JCP.16m11312. PMID: 29244265.
165. Tsai MC, Cheng WL, Sheu JJ, Huang CC, Shia BC, Kao LT, Lin HC. Increased risk of dementia following herpes zoster ophthalmicus. *PLoS One*. 2017 Nov 22;12(11):e0188490. doi: 10.1371/journal.pone.0188490. PMID: 29166672; PMCID: PMC5699837.
166. Bubak AN, Como CN, Coughlan CM, Johnson NR, Hassell JE, Mescher T, Niemeyer CS, Mahalingam R, Cohrs RJ, Boyd TD, Potter H, Russ HA, Nagel MA. Varicella-Zoster Virus Infection of Primary Human Spinal Astrocytes Produces Intracellular Amylin, Amyloid- $\beta$ , and an Amyloidogenic Extracellular Environment. *J Infect Dis*. 2020 Mar 16;221(7):1088-1097. doi: 10.1093/infdis/jiz560. PMID: 31665341; PMCID: PMC7075411.
167. Bae S, Yun SC, Kim MC, Yoon W, Lim JS, Lee SO, Choi SH, Kim YS, Woo JH, Kim SY, Kim SH. Association of herpes zoster with dementia and effect of antiviral therapy on dementia: a population-based cohort study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2021 Aug;271(5):987-997. doi: 10.1007/s00406-020-01157-4. Epub 2020 Jul 1. PMID: 32613564.
168. Grahn A, Nilsson S, Nordlund A, Lindén T, Studahl M. Cognitive impairment 3 years after neurological Varicella-zoster virus infection: a long-term case control study. *J Neurol*. 2013 Nov;260(11):2761-9. doi: 10.1007/s00415-013-7057-1. Epub 2013 Jul 31. PMID: 23900759.
169. Persson A, Bergström T, Lindh M, Namvar L, Studahl M. Varicella-zoster virus CNS disease--viral load, clinical manifestations and sequels. *J Clin Virol*. 2009 Nov;46(3):249-53. doi: 10.1016/j.jcv.2009.07.014. Epub 2009 Aug 25. Erratum in: *J Clin Virol*. 2010 Feb;47(2):203. PMID: 19709927.
170. Schnier C, Duncan S, Wilkinson T, Mbizvo GK, Chin RFM. A nationwide, retrospective, data-linkage, cohort study of epilepsy and incident dementia. *Neurology*. 2020 Sep 22;95(12):e1686-e1693. doi: 10.1212/WNL.0000000000010358. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32680951.

171. Lopatko Lindman K, Hemmingsson ES, Weidung B, Brännström J, Josefsson M, Olsson J, Elgh F, Nordström P, Lövheim H. Herpesvirus infections, antiviral treatment, and the risk of dementia—a registry-based cohort study in Sweden. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2021 Feb 14;7(1):e12119. doi: 10.1002/trc2.12119. PMID: 33614892; PMCID: PMC7882534.
172. Itzhaki RF. Overwhelming Evidence for a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) in Alzheimer's Disease (AD); Underwhelming Evidence against. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jun 21;9(6):679. doi: 10.3390/vaccines9060679. PMID: 34205498; PMCID: PMC8234998.
173. Scherrer JF, Salas J, Wiemken TL, Hoft DF, Jacobs C, Morley JE. Impact of herpes zoster vaccination on incident dementia: A retrospective study in two patient cohorts. *PLoS One*. 2021 Nov 17;16(11):e0257405. doi: 10.1371/journal.pone.0257405. PMID: 34788293; PMCID: PMC8597989.
174. Lehrer S, Rheinstein PH. Herpes Zoster Vaccination Reduces Risk of Dementia. *In Vivo*. 2021 Nov-Dec;35(6):3271-3275. doi: 10.21873/invivo.12622. PMID: 34697158; PMCID: PMC8627719.
175. Itzhaki RF. Corroboration of a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2018 Oct 19;10:324. doi: 10.3389/fnagi.2018.00324. PMID: 30405395; PMCID: PMC6202583.
176. Jamieson GA, Maitland NJ, Craske J, Wilcock GK, Itzhaki RF. Detection of herpes simplex virus type 1 DNA sequences in normal and Alzheimer's disease brain using polymerase chain reaction. *Biochem Soc Trans*. 1991 Apr;19(2):122S. doi: 10.1042/bst019122s. PMID: 1653719.
177. Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet*. 1997 Jan 25;349(9047):241-4. doi: 10.1016/S0140-6736(96)10149-5. PMID: 9014911.
178. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Craske J, Itzhaki RF. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol*. 1991 Apr;33(4):224-7. doi: 10.1002/jmv.1890330403. PMID: 1649907.
179. Lin WR, Wozniak MA, Cooper RJ, Wilcock GK, Itzhaki RF. Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J Pathol*. 2002 Jul;197(3):395-402. doi: 10.1002/path.1127. PMID: 12115887.
180. Readhead B, Haure-Mirande JV, Funk CC, Richards MA, Shannon P, Haroutunian V, Sano M, Liang WS, Beckmann ND, Price ND, Reiman EM, Schadt EE, Ehrlich ME, Gandy S, Dudley JT. Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus. *Neuron*. 2018 Jul 11;99(1):64-82.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.023. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29937276; PMCID: PMC6551233.
181. Allnut MA, Johnson K, Bennett DA, Connor SM, Troncoso JC, Pletnikova O, Albert MS, Resnick SM, Scholz SW, De Jager PL, Jacobson S. Human Herpesvirus 6 Detection in Alzheimer's Disease Cases and Controls across Multiple Cohorts. *Neuron*. 2020 Mar 18;105(6):1027-1035.e2. doi: 10.1016/j.neuron.2019.12.031. Epub 2020 Jan 23. PMID: 31983538; PMCID: PMC7182308.
182. Chorlton SD. Reanalysis of Alzheimer's brain sequencing data reveals absence of purported HHV6A and HHV7. *J Bioinform Comput Biol*. 2020 Feb;18(1):2050012. doi: 10.1142/S0219720020500122. PMID: 32336252.
183. Bar-Or A, Pender MP, Khanna R, Steinman L, Hartung HP, Maniar T, Croze E, Aftab BT, Giovannoni G, Joshi MA. Epstein-Barr Virus in Multiple Sclerosis: Theory and Emerging Immunotherapies: (Trends in Molecular Medicine, 26:3 p:296-310, 2020). *Trends Mol Med*. 2021 Apr;27(4):410-411. doi: 10.1016/j.molmed.2021.01.004. Epub 2021 Feb 17. Erratum for: Trends Mol Med. 2020 Mar;26(3):296-310. PMID: 33608230; PMCID: PMC8445335.

184. Robinson WH, Steinman L. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Science*. 2022 Jan 21;375(6578):264-265. doi: 10.1126/science.abm7930. Epub 2022 Jan 13. PMID: 35025606.
185. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007 Apr;61(4):288-99. doi: 10.1002/ana.21117. PMID: 17444504.
186. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022 Jan 21;375(6578):296-301. doi: 10.1126/science.abj8222. Epub 2022 Jan 13. PMID: 35025605.
187. Rang X, Liu Y, Wang J, Wang Y, Xu C, Fu J. Identification of multiple sclerosis-related genes regulated by EBV-encoded microRNAs in B cells. *Mult Scler Relat Disord*. 2022 Jan 25;59:103563. doi: 10.1016/j.msard.2022.103563. Epub ahead of print. PMID: 35114606.
188. Tao C, Simpson-Yap S, Taylor B, Blizzard L, Lucas R, Ponsonby AL, Broadley S, van der Mei I; AusLong/Ausimmune Investigators Group. Markers of Epstein-Barr virus and Human Herpesvirus-6 infection and multiple sclerosis clinical progression. *Mult Scler Relat Disord*. 2022 Jan 25;59:103561. doi: 10.1016/j.msard.2022.103561. Epub ahead of print. PMID: 35131728.
189. Tonsekar PP, Jiang SS, Yue G. Periodontal disease, tooth loss and dementia: Is there a link? A systematic review. *Gerodontology*. 2017 Jun;34(2):151-163. doi: 10.1111/ger.12261. Epub 2017 Feb 7. PMID: 28168759.
190. Noble JM, Scarmeas N, Papapanou PN. Poor oral health as a chronic, potentially modifiable dementia risk factor: review of the literature. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013 Oct;13(10):384. doi: 10.1007/s11910-013-0384-x. PMID: 23963608; PMCID: PMC6526728.
191. Frenkel H, Harvey I, Needs K. Oral health care education and its effect on caregivers' knowledge and attitudes: a randomised controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002 Apr;30(2):91-100. doi: 10.1034/j.1600-0528.2002.300202.x. PMID: 12000349.
192. Frenkel H, Harvey I, Newcombe RG. Improving oral health in institutionalised elderly people by educating caregivers: a randomised controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2001 Aug;29(4):289-97. doi: 10.1034/j.1600-0528.2001.290408.x. PMID: 11515643.
193. Aida J, Kondo K, Yamamoto T, Hirai H, Nakade M, Osaka K, Sheiham A, Tsakos G, Watt RG. Oral health and cancer, cardiovascular, and respiratory mortality of Japanese. *J Dent Res*. 2011 Sep;90(9):1129-35. doi: 10.1177/0022034511414423. Epub 2011 Jul 5. PMID: 21730255.
194. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci*. 2007;64(4):180-9. doi: 10.1080/09674845.2007.11732784. PMID: 18236742.
195. Hajishengallis G. Too old to fight? Aging and its toll on innate immunity. *Mol Oral Microbiol*. 2010 Feb;25(1):25-37. doi: 10.1111/j.2041-1014.2009.00562.x. PMID: 20305805; PMCID: PMC2839454.
196. Ortega O, Parra C, Zarcero S, Nart J, Sakwinska O, Clavé P. Oral health in older patients with oropharyngeal dysphagia. *Age Ageing*. 2014 Jan;43(1):132-7. doi: 10.1093/ageing/aft164. Epub 2013 Nov 4. PMID: 24190874.

197. Gil-Montoya JA, de Mello AL, Barrios R, Gonzalez-Moles MA, Bravo M. Oral health in the elderly patient and its impact on general well-being: a nonsystematic review. *Clin Interv Aging*. 2015 Feb 11;10:461-7. doi: 10.2147/CIA.S54630. PMID: 25709420; PMCID: PMC4334280.

## ANNEXES

### ANNEXE 1 : Note d'information destinée au représentant légal/tuteur

**UNIVERSITE COTE D'AZUR**



**Laboratoire MICORALIS (Microbiologie orale, Immunothérapie et Santé)  
Faculté de Chirurgie-Dentaire, Pôle St Jean d'Angély – 5 rue du 22eme BCA - 06300  
Nice**

*Responsable scientifique : Dr Alain DOGLIO - CHU de Nice - Téléphone: 04 89 15 22 46*

#### **NOTE D'INFORMATION DESTINEE AU REPRESENTANT LEGAL/TUTEUR**

Madame, Monsieur,

Le laboratoire de Microbiologie Orale, Immunothérapie et Santé (MICORALIS), dirigé par le Dr Alain DOGLIO, est spécialisé dans l'étude des maladies de la bouche et de la flore microbienne orale. Ce laboratoire est affilié à l'Université Côte d'Azur et est localisé dans les locaux de la Faculté de Chirurgie Dentaire au sein du Pôle Universitaire de St Jean d'Angély. MICORALIS développe de nombreux projets de recherche clinique et/ou fondamentale en collaboration étroite avec les Praticiens Hospitaliers du Centre Hospitalier Universitaire de Nice, du Centre Antoine Lacassagne, des équipes de recherche de l'ensemble du territoire national, des équipes internationales, et par des industriels.

Le laboratoire est sujet à conserver des échantillons biologiques dans ses locaux, sous la responsabilité du Dr Alain Doglio (MCUPH – Responsable de l'Unité de thérapie Cellulaire et Génique) . Cette conservation est destinée à archiver des échantillons biologiques (échantillons sanguins, de plasma, d'autres fluides biologiques, de cellules et de tissus) cryoconservés (congelés à -80°C ou -150 °C) ou conservés à température ambiante dans un but de diagnostic et de recherche menée par des équipes de l'Université Côte d'Azur, du Centre Hospitalier Universitaire de Nice, du Centre Antoine Lacassagne, des équipes de recherche de l'ensemble du territoire national, des équipes internationales et par des industriels. Ces travaux pourront être menés après cession ou transfert des échantillons aux différentes parties développant les recherches. Par exemple, les différents travaux pourraient permettre notamment lors d'une prise en charge ultérieure :

- de définir les précurseurs de certains marqueurs, permettant ainsi un dépistage plus précoce de certaines pathologies notamment neurodégénératives, et donc une meilleure prise en charge pour le patient ;
- de réaliser des cultures cellulaires permettant la création d'une banque de lignées cellulaires ;
- de définir des marqueurs permettant de comprendre l'apparition de certaines maladies ;
- d'identifier de nouvelles cibles biologiques conduisant au développement de stratégies thérapeutiques originales.

Des prélèvements oraux peuvent être proposés à votre proche et être effectués suite à sa consultation dans un service du Centre Hospitalier Universitaire de Nice. Les informations concernant les modalités de ces prélèvements vous seront données, ainsi qu'à votre proche, préalablement aux prélèvements et reprises dans un document qui vous sera remis. Votre absence d'opposition à l'utilisation des prélèvements de votre proche sera recueilli comme le prévoit l'article L1111-2 du code de la santé publique, l'article L1121-8 du code de la santé publique modifié par la loi n°2004-806 du 9 août 2004 – art. 88 JORF 11 août 2004, l'article 35 du code de déontologie médicale ou la Charte du patient hospitalisé de 1995.

Les prélèvements effectués seront utilisés dans une finalité de recherche qui n'aura pas de conséquence sur les soins qui seront prodigués à votre proche et ce dernier n'aura pas de bénéfice immédiat.

La participation à l'implémentation de collection d'échantillons biologiques est libre et ne donnera lieu à aucune indemnité.

Vous avez le droit de refuser que des prélèvements soient effectués sur votre proche ou de retirer vous opposer à leur utilisation à tout moment, sans avoir à en expliquer les raisons et sans que votre décision influence en quoi que ce soit la qualité des soins qui lui seront dispensés.

La conservation des échantillons biologiques prélevés s'effectuera au sein de la Faculté de Chirurgie-Dentaire de Nice dans le laboratoire MICORALIS – Site de St Jean d'Angély pour une durée totale de 20 ans reconductible tacitement. Ils implémenteront la collection DC-2021-4413 dont la thématique est microbiologie orale et maladie d'Alzheimer.

### **Traitement des données personnelles**

Pour réaliser des recherches futures dans le domaine médical, il est en outre nécessaire de pouvoir disposer de données cliniques concernant votre proche. Comme vous le savez, celles-ci sont conservées dans son dossier médical et gérées informatiquement, le traitement de ces données est conforme à la loi Informatique et Libertés n°78-17 du 6 Janvier 1978 modifiée et ainsi qu'au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 (règlement général sur la protection des données). Le responsable du traitement informatique est le Président de l'Université Côte d'Azur. L'Université Côte d'Azur a un Délégué à la Protection des Données (DPO), M. Didier MARTIN, que vous pouvez joindre au [didier.MARTIN@univ-cotedazur.fr](mailto:didier.MARTIN@univ-cotedazur.fr) et qui pourra répondre à toutes vos questions concernant la protection des données personnelles.

Ces données médicales fournissent des renseignements indispensables pour mener à bien ces travaux ; en effet, les nouvelles connaissances sur les maladies sont produites grâce au rapprochement des résultats de la recherche scientifique avec des données cliniques des maladies et de leur évolution.

Les données non-nominatives vous concernant peuvent être conservées dans une base de données pendant une durée de dix ans après la destruction de l'échantillon biologique. La licéité de ce traitement informatique est l'intérêt légitime poursuivi par l'Université Côte d'Azur des fins d'amélioration du suivi de certaines pathologies, à des fins de recherche scientifique et de publications.

L'accès direct à ces différentes données se fera sous la responsabilité d'un médecin par des personnes soumises au secret professionnel et collaborant à la constitution de cette biobanque.

Dans le cadre de certains projets de recherche, le laboratoire MICORALIS peut également être amené, après vous avoir informé individuellement, ainsi que votre proche et sauf opposition de votre part, à transmettre ses données non-nominatives à d'autres professionnels de santé, le résultat de ces exploitations ne pouvant permettre de le ré-identifier. Dans ce cadre, les informations qui le concernent sont susceptibles d'être déposées chez un hébergeur de données de santé certifié à cet effet et traitées par des partenaires externes intervenant dans la recherche.

La mise en place d'une recherche des caractéristiques génétiques constitutionnelles et la cession d'échantillons à partir d'échantillons biologiques tissulaires et/ou de fluides congelés ou à température ambiante (dont les siennes), feront l'objet d'une information et d'un consentement qui vous seront transmis afin de recueillir votre décision à cette nouvelle utilisation.

Conformément à la réglementation applicable, vous disposez de différents droits à savoir : droit à l'information, droit d'accès, droit de rectification, droit à l'effacement, droit à la limitation du traitement des données personnelles de votre proche, droit d'opposition, droit de retirer votre consentement, droit à la portabilité des données (vous pouvez si vous le désirez récupérer ses données pour votre usage personnel ou si cela est possible les transférer à un tiers) (pour plus d'informations contacter le DPO).

Vous pouvez exercer votre droit d'accès et de rectification aux informations qui le concernent, une limitation du traitement relatif à sa personne, retirer votre accord ou exercer votre droit à la portabilité en écrivant au Directeur Général / Délégué à la Protection des Données (DPO) de l'Université Côte d'Azur (Mail à [didier.MARTIN@univ-cotedazur.fr](mailto:didier.MARTIN@univ-cotedazur.fr) ou Courrier à l'attention du Délégué à la Protection des données (DPO), Faculté de Chirurgie-dentaire, Pôle St Jean d'Angély, 5 rue du 22eme BCA, 06300 Nice.) De même, vous pouvez vous opposer à la participation de votre proche à un traitement des

données le concernant pour des motifs légitimes, sans que cela ne modifie en aucune façon la prise en charge médicale réalisée par son médecin.

Vous avez également le droit de porter une réclamation auprès de la Commission nationale Informatique et Libertés si ses données ne sont pas traitées conformément à la réglementation des données personnelles.

**Votre accord pour que votre proche participe est nécessaire pour que :**

- Des prélèvements oraux (salive et plaque dentaire) soient effectués dans sa bouche et conservés par congélation pour « archivage » dans la cadre de la mise en place d'une collection,
  - Ces échantillons biologiques soient utilisés dans le futur à des fins de recherche scientifique, dans des projets spécifiques, dans ce cas vous serez sollicité pour un nouveau consentement dédié à cette étude.
  - Les données cliniques et biologiques concernant votre proche rendues non nominatives soient centralisées dans une base de données et mise à disposition des cliniciens et des chercheurs sous la responsabilité du Dr DOGLIO Alain, **Directeur du laboratoire MICORALIS;**
- Cet accord est révoquant à tout moment. Afin d'exprimer votre souhait, nous vous demandons de bien vouloir lire et signer le document de non-opposition qui se trouve à la suite de cette note d'information.

Quelle que soit votre décision, nous tenons à vous remercier de l'attention que vous avez portée à la lecture de ce document.

Si vous souhaitez obtenir des informations complémentaires, vous pouvez contacter le Dr BORSA Leslie responsable au 04 89 15 22 54 ou le Dr Doglio au 04 89 15 22 46.

**ANNEXE 2 : Non-opposition du représentant légal/tuteur pour son proche**

**UNIVERSITE COTE D'AZUR**



**Laboratoire MICORALIS (Microbiologie orale, Immunothérapie et Santé)  
Faculté de Chirurgie-Dentaire, Pôle St Jean d'Angély – 5 rue du 22eme BCA - 06300  
Nice**

*Responsable scientifique : Dr Alain DOGLIO - CHU de Nice - Téléphone: 04 89 15 22 46*

**NON-OPPOSITION DE CONSERVATION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES ET TISSULAIRES  
ET D'UTILISATION DES DONNEES PERSONNELLES RENDUES NON NOMINATIVES du  
REPRESENTANT LEGAL/TUTEUR pour son proche**

Je soussigné(e),

Nom ..... Prénom

..... Date de naissance : \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

Agissant en ..... qualité de:

.....  
.....

Pour le patient :

Nom ..... Prénom

..... Date de naissance : \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

Suite à la lecture ce jour, des informations présentes dans la note ci-jointe et aux explications données par le médecin, notamment sur :

- La réalisation de prélèvements oraux (salive et plaque dentaire) dans le pôle Odontologie du Pr Claire LASSAUZAY (Centre Hospitalier Universitaire de Nice) et leur conservation pour « archivage » dans le laboratoire MICORALIS de la Faculté de Chirurgie-Dentaire de Nice,
- La réalisation à partir de ces échantillons de cultures cellulaires permettant la création d'une biobanque congelée,
- L'utilisation de ces échantillons à visée de recherche,
- La constitution d'une base de données médicales comprenant certaines de ses données cliniques rendues non nominatives qui pourra être mise à disposition des cliniciens et chercheurs sous la responsabilité du Dr DOGLIO,
- Les différents droits liés au traitement de ses données personnelles

Le Docteur .....m'a expliqué la nature des études éventuelles qui pourront, dans le futur, être effectuées sur les échantillons prélevés et conservés par les équipes de l'Université Côte d'Azur, du Centre Hospitalier universitaire de Nice (INSERM /CNRS), du Centre Antoine Lacassagne, ou d'autres équipes nationales, internationales et éventuellement par des industriels, et le fait qu'elles feront appel aux techniques de biologie cellulaire et moléculaire, qu'elles pourront s'étendre sur plusieurs années et que les échantillons biologiques de mon proche seront conservés en ce sens pour une durée de 20 années reconductibles tacitement à partir de la date de leur prélèvement.

D'autre part, j'ai été informé(e) que la création de cette collection ne comportait aucun risque pour mon proche, qu'elle était sans bénéfice direct pour lui, mais permettra de mieux traiter les patients dans le futur.

J'ai été informé(e) que certaines données rendues non nominatives le concernant feront l'objet d'un traitement informatisé, respectant la loi Informatique et Libertés n°78-17 du 6 Janvier 1978 modifiée le 20 juin 2018 et ainsi au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 applicable à compter du 25 mai 2018 (règlement général sur la protection des données). J'ai été informé(e) des différents droits dont je dispose concernant mon proche pour ce traitement informatisé.



**JE DONNE MON ACCORD POUR L'UTILISATION D'ECHANTILLONS ISSUS DU SOIN A DES FINS DE RECHERCHES SCIENTIFIQUES. J'ACCEPTE QUE LES DONNEES MEDICALES RENDUES NON NOMINATIVES RECUEILLIES PENDANT SES SOINS ET ASSOCIEES AUX ECHANTILLONS SOIENT L'OBJET D'UN TRAITEMENT INFORMATISE ET D'UNE DIFFUSION DANS LE CADRE DE PROJETS DE RECHERCHE.**

**JE NE DONNE PAS MON ACCORD POUR L'UTILISATION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES ET DONNEES ASSOCIEES ISSUS DU SOIN.**

Je sais que ma décision est révoicable, et qu'en cas de changement de décision de ma part, je pourrai demander la destruction des échantillons provenant de mon proche et qui sont encore conservés au sein du Laboratoire MICORALIS uniquement pour des raisons scientifiques ainsi que les données médicales associées.

Fait en double exemplaire dont un remis au responsable légal.

A.....le .....

A.....le .....

Signature du Médecin

Signature du sujet précédé(e)

de la mention « lu et approuvé »

### ANNEXE 3 : Note d'information destinée au patient

#### UNIVERSITE COTE D'AZUR



**Laboratoire MICORALIS (Microbiologie orale, Immunothérapie et Santé)  
Faculté de Chirurgie-Dentaire, Pôle St Jean d'Angély – 5 rue du 22eme BCA - 06300  
Nice**

*Responsable scientifique : Dr Alain DOGLIO - CHU de Nice - Téléphone:04 89 15 22 46*

#### **NOTE D'INFORMATION DESTINEE AU PATIENT**

Madame, Monsieur,

Le laboratoire de Microbiologie Orale, Immunothérapie et Santé (MICORALIS), dirigé par le Dr Alain DOGLIO, est spécialisé dans l'étude des maladies de la bouche et de la flore microbienne orale. Ce laboratoire est affilié à l'Université Côte d'Azur et est localisé dans les locaux de la Faculté de Chirurgie Dentaire au sein du Pôle Universitaire de St Jean d'Angély. MICORALIS développe de nombreux projets de recherche clinique et/ou fondamentale en collaboration étroite avec les Praticiens Hospitaliers du Centre Hospitalier Universitaire de Nice, du Centre Antoine Lacassagne, des équipes de recherche de l'ensemble du territoire national, des équipes internationales, et par des industriels.

Le laboratoire est sujet à conserver des échantillons biologiques dans ses locaux, sous la responsabilité du Dr Alain Doglio (MCUPH – Responsable de l'Unité de thérapie Cellulaire et Génique) . Cette conservation est destinée à archiver des échantillons biologiques (échantillons sanguins, de plasma, d'autres fluides biologiques, de cellules et de tissus) cryoconservés (congelés à -80°C ou -150 °C) ou conservés à température ambiante dans un but de diagnostic et de recherche menée par des équipes de l'Université Côte d'Azur, du Centre Hospitalier Universitaire de Nice, du Centre Antoine Lacassagne, des équipes de recherche de l'ensemble du territoire national, des équipes internationales et par des industriels. Ces travaux pourront être menés après cession ou transfert des échantillons aux différentes parties développant les recherches. Par exemple, les différents travaux pourraient permettre notamment lors d'une prise en charge ultérieure :

- de définir les précurseurs de certains marqueurs, permettant ainsi un dépistage plus précoce de certaines pathologies notamment neurodégénératives, et donc une meilleure prise en charge pour le patient ;
- de réaliser des cultures cellulaires permettant la création d'une banque de lignées cellulaires ;
- de définir des marqueurs permettant de comprendre l'apparition de certaines maladies ;
- d'identifier de nouvelles cibles biologiques conduisant au développement de stratégies thérapeutiques originales.

Des prélèvements oraux peuvent vous être proposés et être effectués suite à votre consultation dans un service du Centre Hospitalier Universitaire de Nice. Les informations concernant les modalités de ces prélèvements vous seront données préalablement aux prélèvements et reprises dans un document qui vous sera remis et votre consentement sera recueilli comme le prévoit l'article L1111-2 du code de la santé publique, l'article 35 du code de déontologie médicale ou la Charte du patient hospitalisé de 1995.

Les prélèvements effectués seront utilisés dans une finalité de recherche qui n'aura pas de conséquence sur les soins qui vous seront prodigués et vous n'aurez pas de bénéfice immédiat.

Votre participation à l'implémentation de collection d'échantillons biologiques est libre et ne donnera lieu à aucune indemnité.

Vous avez le droit de refuser ces prélèvements ou de retirer votre consentement à tout moment, sans avoir à en expliquer les raisons et sans que votre décision influence en quoi que ce soit la qualité des soins que vous recevrez.

La conservation des échantillons biologiques prélevés s'effectuera au sein de la Faculté de Chirurgie-Dentaire de Nice dans le laboratoire MICORALIS – Site de St Jean d'Angély pour une durée totale de 20 ans reconductible tacitement. Ils implémenteront la collection DC-2021-4413 dont la thématique est microbiologie orale et maladie d'Alzheimer.

### **Traitement des données personnelles**

Pour réaliser des recherches futures dans le domaine médical, il est en outre nécessaire de pouvoir disposer de données cliniques vous concernant. Comme vous le savez, celles-ci sont conservées dans votre dossier médical et gérées informatiquement, le traitement de ces données est conforme à la loi Informatique et Libertés n°78-17 du 6 Janvier 1978 modifiée et ainsi qu'au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 (règlement général sur la protection des données). Le responsable du traitement informatique est le Président de l'Université Côte d'Azur. L'Université Côte d'Azur a un Délégué à la Protection des Données (DPO), M. Didier MARTIN, que vous pouvez joindre au [didier.MARTIN@univ-cotedazur.fr](mailto:didier.MARTIN@univ-cotedazur.fr) et qui pourra répondre à toutes vos questions concernant la protection des données personnelles.

Ces données médicales fournissent des renseignements indispensables pour mener à bien ces travaux ; en effet, les nouvelles connaissances sur les maladies sont produites grâce au rapprochement des résultats de la recherche scientifique avec des données cliniques des maladies et de leur évolution.

Les données non-nominatives vous concernant peuvent être conservées dans une base de données pendant une durée de dix ans après la destruction de l'échantillon biologique. La licéité de ce traitement informatique est l'intérêt légitime poursuivi par l'Université Côte d'Azur des fins d'amélioration du suivi de certaines pathologies, à des fins de recherche scientifique et de publications.

L'accès direct à ces différentes données se fera sous la responsabilité d'un médecin par des personnes soumises au secret professionnel et collaborant à la constitution de cette biobanque.

Dans le cadre de certains projets de recherche, le laboratoire MICORALIS peut également être amené, après vous avoir informé individuellement et sauf opposition de votre part, à transmettre vos données non-nominatives à d'autres professionnels de santé, le résultat de ces exploitations ne pouvant permettre de vous ré-identifier. Dans ce cadre, les informations vous concernant sont susceptibles d'être déposées chez un hébergeur de données de santé certifié à cet effet et traitées par des partenaires externes intervenant dans la recherche.

La mise en place d'une recherche des caractéristiques génétiques constitutionnelles et la cession d'échantillons à partir d'échantillons biologiques tissulaires et/ou de fluides congelés ou à température ambiante (dont les vôtres), feront l'objet d'une information et d'un consentement qui vous seront transmis afin de recueillir votre décision à cette nouvelle utilisation.

Conformément à la réglementation applicable, vous disposez de différents droits à savoir : droit à l'information, droit d'accès, droit de rectification, droit à l'effacement, droit à la limitation du traitement de vos données personnelles, droit d'opposition, droit de retirer votre consentement, droit à la portabilité des données (vous pouvez si vous le désirez récupérer vos données pour votre usage personnel ou si cela est possible les transférer à un tiers) (pour plus d'informations contacter le DPO).

Vous pouvez exercer votre droit d'accès et de rectification aux informations qui vous concernent, une limitation du traitement relatif à votre personne, retirer votre consentement ou exercer votre droit à la portabilité en écrivant au Directeur Général / Délégué à la Protection des Données (DPO) de l'Université Côte d'Azur (Mail à [didier.MARTIN@univ-cotedazur.fr](mailto:didier.MARTIN@univ-cotedazur.fr) ou Courrier à A l'attention du Délégué à la Protection des données (DPO), Faculté de Chirurgie-dentaire, Pôle St Jean d'Angély, 5 rue du 22eme BCA, 06300 Nice.) De même, vous pouvez vous opposer à votre participation à un traitement des données vous concernant pour des motifs légitimes, sans que cela ne modifie en aucune façon la prise en charge médicale réalisée par votre médecin.

Vous avez également le droit de porter une réclamation auprès de la Commission nationale Informatique et Libertés si vos données ne sont pas traitées conformément à la réglementation des données personnelles.

## **Votre accord de participation**

### **Votre accord de participation est nécessaire pour que :**

- Des prélèvements oraux (salive et plaque dentaire) soient effectués dans votre bouche et conservés par congélation pour « archivage » dans la cadre de la mise en place d'une collection,
- Ces échantillons biologiques soient utilisés dans le futur à des fins de recherche scientifique, dans des projets spécifiques, dans ce cas vous serez sollicité pour un nouveau consentement dédié à cette étude.
- Vos données cliniques et biologiques rendues non nominatives soient centralisées dans une base de données et mise à disposition des cliniciens et des chercheurs sous la responsabilité du Dr DOGLIO Alain, **Directeur du laboratoire MICORALIS;**

Cet accord est révocable à tout moment. Afin d'exprimer votre souhait, nous vous demandons de bien vouloir lire et signer le document de non-opposition qui se trouve à la suite de cette note d'information.

Quelle que soit votre décision, nous tenons à vous remercier de l'attention que vous avez portée à la lecture de ce document.

Si vous souhaitez obtenir des informations complémentaires, vous pouvez contacter le Dr BORSA Leslie responsable au 04 89 15 22 54 ou le Dr Doglio au 04 89 15 22 46.

**ANNEXE 4 : Non-opposition du patient**

**UNIVERSITE COTE D'AZUR**



**Laboratoire MICORALIS (Microbiologie orale, Immunothérapie et Santé)  
UFR d'Odontologie, Pôle St Jean d'Angély - 24 avenue des Diables Bleus - 06357 Nice  
Cedex 4**

*Responsable : Dr Alain DOGLIO - CHU de Nice - Téléphone:04 89 15 22 46*

**CONSENTEMENT DE CONSERVATION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES ET TISSULAIRES  
ET D'UTILISATION DES DONNÉES PERSONNELLES RENDUES NON NOMINATIVES**

Je soussigné(e),

Nom ..... Prénom

..... Date de naissance : \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

Suite à la lecture ce jour, des informations présentes dans la note ci-jointe et aux explications données par le médecin, notamment sur :

- La réalisation de prélèvements oraux (salive et plaque dentaire) dans le pôle Odontologie du Pr Claire LASSAUZAY (Centre Hospitalier Universitaire de Nice) et leur conservation pour « archivage » dans le laboratoire MICORALIS de la Faculté de Chirurgie-Dentaire de Nice,
- La réalisation à partir de ces échantillons de cultures cellulaires permettant la création d'une biobanque congelée,
- L'utilisation de ces échantillons à visée de recherche,
- La constitution d'une base de données médicales comprenant certaines de mes données cliniques rendues non nominatives qui pourra être mise à disposition des cliniciens et des chercheurs sous la responsabilité du Dr DOGLIO Alain,
- Les différents droits liés au traitement de mes données personnelles.

Le Docteur .....m'a expliqué la nature des études éventuelles qui pourront, dans le futur, être effectuées sur les échantillons prélevés et conservés par les équipes de l'Université Côte d'Azur, du Centre Hospitalier universitaire de Nice (INSERM /CNRS), du Centre Antoine Lacassagne, ou d'autres équipes nationales, internationales et éventuellement par des industriels, et le fait qu'elles feront appel aux techniques de biologie cellulaire et moléculaire, qu'elles pourront s'étendre sur plusieurs années et que mes échantillons biologiques seront conservés en ce sens pour une durée de 20 années reproductibles tacitement à partir de la date de leur prélèvement.

D'autre part, j'ai été informé(e) que la création de cette collection ne comportait aucun risque pour moi, qu'elle était sans bénéfice direct pour moi, mais permettra de mieux traiter les patients dans le futur.

J'ai été informé(e) que certaines données rendues non nominatives me concernant feront l'objet d'un traitement informatisé, respectant la loi Informatique et Libertés n°78-17 du 6 Janvier 1978 modifiée le 20 juin 2018 et ainsi au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 applicable à compter du 25 mai 2018 (règlement général sur la protection des données). J'ai été informé(e) des différents droits dont je dispose concernant ce traitement informatisé.

**JE DONNE MON ACCORD POUR L'UTILISATION D'ÉCHANTILLONS ISSUS DU SOIN A DES FINS DE RECHERCHES SCIENTIFIQUES. J'ACCEPTÉ QUE LES DONNÉES MÉDICALES RENDUES NON NOMINATIVES RECUEILLIES PENDANT MES SOINS ET ASSOCIÉES AUX ÉCHANTILLONS SOIENT L'OBJET D'UN TRAITEMENT INFORMATISÉ ET D'UNE DIFFUSION DANS LE CADRE DE PROJETS DE RECHERCHE.**

**JE NE DONNE PAS MON ACCORD POUR L'UTILISATION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES ET DONNÉES ASSOCIÉES ISSUS DU SOIN.**

Je sais que ma décision est révocable, et qu'en cas de changement de décision de ma part, je pourrai demander la destruction des échantillons provenant de ma personne et qui sont encore conservés au sein du Laboratoire MICORALIS uniquement pour des raisons scientifiques ainsi que les données médicales associées.

Fait en double exemplaire dont un remis au patient.

A.....le .....  
A.....le .....  
Signature du Médecin

Signature du sujet précédé(e)  
de la mention « lu et

approuvé »

## ANNEXE 5: Budget du projet ORAMICAL

AOI 2021 ORAMICAL					
<b>Établissement promoteur :</b> CHU de Nice ORAMICAL		<b>Investigateur coordonateur: Dr Borsa</b> N° interne du protocole			
NATURE DE LA DEPENSE	DESCRIPTION	2021	2022	2023	Total en €
(PM) Personnel médical	vacation				0
	déplacements				0
(NM) Personnel non médical	Vacation ARC	1 (4h) = 250	1 (4h) = 250		500
	déplacements				0
<b>Pharmacie</b>					
Pharmacie					0
(ME) Médicaments					0
(DM) Dispositif Médical					0
<b>Fournitures / petit matériel de laboratoire (EC)</b>					
Petit matériel médical	Matériel pour prélèvement sanguin	125	125		250
Fournitures de laboratoires	Consommables	500	500		1000
documentation	impression de CRF	300			300
	fournitures bureau	100			100
	papeterie				
<i>sous-total fournitures matériel</i>					1650
<b>Matériel Médical et maintenance (IB)</b>					
Location d'équipement					0
Maintenance et réparation					0
<b>Réactifs de laboratoire (LR)</b>					
Réactifs de laboratoire	188 prélèvements en technologie Biomark = 5000 100 prélèvements sanguins pour analyse de cytokines = 1500			viro-immuno	6500
transport échantillons bio					0

<i>sous-total réactifs laboratoire</i>					6400
<b>Dépenses internes CHU de Nice (virement UF/UF)</b>					
Analyses laboratoire					0
Imagerie					0
Actes	Prélèvement sanguin (1.5 AMI x94)	222.5	222.5		445
<i>sous-total dépenses internes</i>					445
<b>Prestations - Hors CHU de Nice (FI)</b>					
Assurance	Responsabilité civile				900
centres associés	frais de gestion				0
	surcouts				0
frais de traduction					0
frais de publication					0
indemnisation / transport patients					0
Personnel extérieur CHUN					0
services extérieurs	location, frais spécifiques				0
sous-traitance					0
<i>sous-total prestations</i>					900
<b>Gestion</b>					
(SI) Système d'information	Logiciel, licence, crédit-bail				0
CRC					0
Frais de gestion (CHUN)					0
Frais de méthodo (CHUN)					0
Frais de statistiques (CHUN)					0
<b>TOTAL</b>		0	0	0	9895