



HAL
open science

Le microbiote oral, acteur majeur de notre santé générale

Matthieu Minty

► **To cite this version:**

Matthieu Minty. Le microbiote oral, acteur majeur de notre santé générale. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30237 . tel-04238452

HAL Id: tel-04238452

<https://theses.hal.science/tel-04238452>

Submitted on 12 Oct 2023

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

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

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Matthieu MINTY

Le 27 septembre 2021

Le microbiote oral, acteur majeur de notre santé générale.

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par

Vincent BLASCO-BAQUE

Jury

M. Pierre-Yves Collart DUTILLEUL, Rapporteur

Mme Sophie JUNG, Rapporteur

M. Remy BURCELIN, Examineur

Mme Cathy NABET, Examinatrice

M. Frédéric CUISINIER, Examineur

M. Vincent BLASCO BAQUE, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Monsieur le Docteur Vincent Blasco, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi et tout le savoir que vous m'avez apporté. Je vous dois énormément, et je m'efforcerai d'être à la hauteur de vos espérances.

Madame Pascale Loubière et Monsieur Vincent Azalbert, je tiens à vous remercier pour votre patience, votre soutien et aussi pour les bons moments passés en votre compagnie.

Madame Sophie Jung et Monsieur Pierre Yves Collart-Dutilleul, un grand merci d'avoir accepté de rapporter ce travail et de participer à cette soutenance.

Monsieur le Professeur Rémy Burcelin, je vous remercie pour votre soutien et vos encouragements depuis mes débuts, merci pour vos nombreux conseils et analyses scientifiques forts de votre grande expérience.

Madame Cathy Nabet et Monsieur Frédéric Cuisinier, je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de lire ce travail et de bien vouloir participer à mon jury.

A toute l'équipe DINAMIX, merci de nous avoir acceptés, nous simples dentistes dans votre monde... Merci à Madame le Docteur Anne Bouloumié de nous avoir accueillis dans son équipe et de nous avoir permis de partager sa large expertise.

A ma famille proche, ma mère, mon père et mon frère qui m'ont toujours porté et soutenu depuis le 1^{er} jour dans ma nouvelle aventure de recherche. Merci pour votre aide si précieuse dans ma vie toute entière.

A mes Amis, mes vieux amis Hugo, Yann, Plus, Nico, à mes Amis de dentaire Jordane, Alan, Nono, Flora, Chloé, Laulau, Doudou, Charlotte mais aussi à Max, Justin et les petits nouveaux mais tellement important Golden et Edgar.

A la personne qui partage ma vie, Laura, merci d'arriver à me supporter au quotidien, merci de ton soutien permanent, ce n'est que le début de notre grande histoire.

ABREVIATIONS

Abréviations Français	Abbrev Anglais	Signification (Français)	Meaning (Anglais)
ACE	ACE	plus les probabilités sont hétérogènes, plus le nombre d'espèces non observées sera grand	Abundance-Based Coverage Estimator
ACP	PCA	Analyse en Composantes Principales	Principal Component Analysis
ADN	DNA	Acide désoxyribonucléique	Deoxyribonucleique Acid
AGL	FFA	Acides Gras Libres	Free Fatty Acids
AMP	AMP	Peptides anti microbiens	Anti-microbial peptides
ARN	RNA	Acide ribonucléique	Ribonucleique Acid
BD	BD	Becton Dickinson	Becton Dickinson
BOP	BOP	Saignement au sondage	Bleeding on Probing
CAO	DMF	Nombre de dents cariées, absentes, obturées	Decayed, missing or filled teeth
CG	CG	Groupe contrôle	Control group
CGF	CGF	Facteur de croissance dérivé du ciment	Cementum-derived Growth Factor
COVID	COVID	Maladie due au Corona virus	Corona Virus disease
DAMP	DAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes	Damage-associated molecular pattern
DT1	T1D	Diabète de Type 1	Type 1 diabete
DT2	DT2	Diabète de Type 2	Type 2 diabete
EGF	EGF	Facteur de croissance des cellules épithéliales	Epithelial Growth Factor
HFD	HFD	Régime hyper lipidique	High Fat Diet
HOMD	HOMD	Data base du microbiome humain	Human Oral Microbiome Data Base
IA	AI	Intelligence artificielle	Artificial intelligence

IC	IC	Intervalle de Confiance	Confidence Interval
IFN	IFN	Interféron	Interferon
Ig	Ig	Immunoglobulines	Immunoglobulin
IGF	IGF	Facteur de Croissance apparenté à l'insuline	Insulin-Like Growth Factor
IL	IL	Interleukine	Interleukin
IL17	IL17	Interleukine 17	Interleukin 17
IMC	BMI	Indice de Masse Corporelle	Body Mass Index
iNOS	iNOS	Oxyde Nitrique Synthase	Inducible Nitric Oxide Synthetase
IP	PI	Indice de Plaque	Plaque Index
IR	IR	Résistance à l'insuline	Insulin Resistance
IRS	IRS	Substrat des Récepteurs de l'Insuline	Insulin Receptor Substrate
JNK	JNK	Kinase JNK	c-Jun Terminal Kinase
KEGG	KEGG	Encyclopédie de Kyoto des Gènes et Génomes	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KO	KO	Délétion fonctionnelle d'un gène	Knock-out
KW	KW	Test de Kruskal-Wallis	Kruskal-Wallis Test
LBP	LBP	Protéine se liant à au LPS	LPS-Binding Protein
LDA	LDA	Analyse Discriminante Linéaire	Linear Discriminant Analysis
LEfSe	LEfSe	Cladogramme	Linear discriminant Analysis Effect Size
LPA	LPA	Lésions Péri-Apicales	Peri-apical Lesion
LPL	LPL	Lipoprotéines Lipases	Lipoprotein Lipases
LPS	LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharide
LSI	LSI	Indice de Lœe et Sillness	Lœe & Sillness Index
MMP	MMP	Métallo protéase de matrice	Matrix Metalloproteinase
NASH	NASH	Stéatose Hépatique Non-Alcoolique	Non-Alcoholic Steato Hepatitis

NFS	CBC	Numération de la Formule Sanguine	Complete Blood Count
NGF	NGF	Factor de croissance des nerfs	Nerve Growth Factor
OSCC	OSCC	Carcinomes oraux	Oral Squamous Cell Carcinoma
OTU	OTU	Unités Taxonomiques Opérationnelles	Operational Taxonomic Units
PAMP	PAMP	Configuration moléculaire associée aux pathogènes	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PCoA	PCoA	Analyse en Coordonnées Principales	Principal Coordinate Analysis
PFA	PFA	Paraformaldéhyde	Paraformaldehyde
<i>Pg</i>	<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PRG	PRG	Groupe de Joueurs de Rugby Professionnels	Professional Rugby players Group
PRR	PRR	Récepteurs de reconnaissance de Motifs	Pattern Recognition Receptor
ROS	ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène Radicaux oxygénés libres	Reactive Oxygen Species
SEM	SD	Ecart Standard à la Moyenne	Standard Deviation
Sham	Sham	Une expérience contrôle dans laquelle tous les paramètres sont identiques, mais sans l'ajout de produit	Control experiment
SiC	SiC	Caries significatives	Significant caries
TGF	TGF	Facteur de croissance	Transforming Growth Factor
TH17	TH17	Lymphocytes T auxiliaires produisant l'IL17	T Helper Cells making IL17
TLR	TLR	Type de récepteur de reconnaissance de forme	Toll Like Receptor
TNF a	TNF a	Facteur de nécrose tumorale a	Tumor Necrosis Factor a
UFC	CFU	Unités de Formation de Colonies	Colony Forming Units
VDR	VDR	Récepteur à la vitamine D	Vitamine D Receptor
VIH	VIH	virus de l'immunodéficience humaine	Human immunodeficiency
WT	WT	Type Sauvage (non-muté)	Wild-type

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique d'une dent (A)	- 11 -
Figure 2: LEfSe ou cladogramme représentant le microbiote de deux groupes d'individus dans les conditions alimentaires à jeun puis nourris (11).....	- 15 -
Figure 3: Diversité Alpha du microbiote oral en fonction du régime alimentaire (11).....	- 16 -
Figure 4: Représentation en ellipse de la Bêta diversité du microbiote oral selon le statut nutritionnel (11).....	- 17 -
Figure 5: Microbiote oral vu sous microscopie électronique à balayage après coloration des bactéries. (http://www.gettyimages.com)	- 17 -
Figure 6 : Acquisition du microbiote lié aux facteurs maternels et à l'enfant (17)	- 19 -
Figure 7: Complexes bactériens selon Socransky (20).....	- 21 -
Figure 8 : Représentation de la formation et du développement d'un biofilm jusqu'à sa dissémination dans l'organisme (https://www.information-dentaire.fr).....	- 22 -
Figure 9: Composition schématique d'un biofilm (24)	- 23 -
Figure 10 : Coupe schématique d'une dent et de ses composants par le Dr Albert Hauteville (Conseil Dentaire Dr. Hauteville).....	- 24 -
Figure 11 : Les différentes étapes de la maladie parodontale associée à l'augmentation de bactéries à Gram négatif par le Dr Vincent Ronco (Paris) et modifié par M. Minty.	- 27 -
Figure 12 : Inflammation généralisée avec présence de tartre et de plaque inter-dentaire (crédit photo Dr Thomas Charlotte).....	- 28 -
Figure 13: Physiopathologie des maladies parodontales et relations bidirectionnelles avec les pathologies métaboliques	- 30 -
Figure 14: Anatomie des Glandes Salivaires	- 33 -
Figure 15 : Impact de la dysbiose du microbiote oral sur les troubles métaboliques et thérapeutiques	- 39 -
Figure 16 : Prévalence du diabète chez les adultes en 2019 par IDF Diabète Atlas (https://diabetesatlas.org/fr/sections/demographic-and-geographic-outline.html).....	- 41 -
Figure 17 : Description des différentes voies de signalisation de l'insulino résistance (https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1957255715300754).....	- 44 -
Figure 18 : Schéma d'une inflammation chronique de bas grade	- 47 -
Figure 19: Parcours d'un signal inflammatoire extracellulaire vers le noyau (https://iepp-eu.com/wp-content/uploads/2013/04/23_Lettre_IEPP_inflammation-chronique.pdf)....	- 49 -
Figure 20 : Médiateurs cellulaires de l'inflammation	- 50 -
Figure 21: Dysbiose du microbiote salivaire dans le groupe de joueurs de Rugby professionnels comparé au groupe témoin.	- 61 -
Figure 22: A) Analyse linéaire discriminante (LDA = Linear Discriminant Analysis). Cladogramme représentant l'effet de taille (LEfSe = Effect Size Cladogram) d'une analyse par paire des deux groupes (CG et PRG) des séquences de l'ADN 16S dans la salive. B) Histogramme de l'abondance relative (%) pour des groupes taxonomiques identifiés par des lettres isolées dans le cladogramme (Données indiquées avec un moyen +/- erreur standard moyenne ; *P<0,05, **P< 0,01 ; *** P<0,001 ; ****P< 0,0001, test non-apparié de Mann-Whitney et score LDA de 2,0 pour les cladogrammes).	- 62 -
Figure 23: Microbiote « cariogène » dans le groupe PRG comparé au groupe témoin	- 64 -
Figure 24: Analyse des composants principaux (PCA = Principal Component Analysis) entre les bactéries du microbiote salivaire, et des paramètres oraux et systémiques	- 66 -

<i>Figure 25: Analyse en Composantes Principales (ACP) pour déterminer si certains paramètres caractérisent mieux les groupes (PRG-B vs PRG-F) et CG.</i>	<i>- 68 -</i>
<i>Figure 26: Microbiote oral (salive) avant et après la prise alimentaire chez tous les sujets- 82 -</i>	<i>- 82 -</i>
<i>Figure 27: Comparaison de l'état du microbiote salivaire chez les hommes et les femmes quand ils sont à jeun. A : Cladogramme linéaire basé sur l'analyse de la taille de l'effet d'analyse discriminante (LEfSe) pour le microbiote oral à partir de salive de femme à jeun par rapport à la salive d'homme à jeun pour l'analyse de la séquence 16S ADN de ces échantillons de salive. LDA score 2.0 pour cladogrammes</i>	<i>- 84 -</i>
<i>Figure 28: Comparaison de l'état du microbiote salivaire chez les femmes et les hommes quand ils sont nourris.</i>	<i>- 86 -</i>
<i>Figure 29 : Corrélation positive entre le changement glycémique et le changement de l'activité lipase dans la salive.....</i>	<i>- 87 -</i>
<i>Figure 30: Schéma du mécanisme de délétion de la partie O-polysaccharide (antigène-O) du LPS de Pg.</i>	<i>- 97 -</i>
<i>Figure 31: Chronologie des expérimentations animales.....</i>	<i>- 98 -</i>
<i>Figure 32: La lyse osseuse induite par Porphyromonas gingivalis (Pg) nécessite la présence d'un LPS complet et d'IL17. Un mois après la colonisation endodontique les souris ont été mises sous HFD pendant deux mois supplémentaires.</i>	<i>- 102 -</i>
<i>Figure 33: La lésion péri-apicale induite par Pg entraîne des désordres métaboliques passant par la voie immunitaire TH 17 sous HFD.....</i>	<i>- 104 -</i>
<i>Figure 34: La lésion péri-apicale induite par Pg entraîne des désordres immuno-inflammatoires systémiques, aggravés par la présence de son LPS complet et d'IL 17....</i>	<i>- 106 -</i>
<i>Figure 35: Corrélation linéaire des paramètres cliniques et des paramètres métaboliques.....</i>	<i>- 108 -</i>
<i>Figure 36: Schéma linéaire de synthèse des résultats obtenus et des perspectives de ce travail</i>	<i>- 113 -</i>

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION	- 9 -
2	LE MICROBIOTE ORAL	- 11 -
2.1	Introduction sur le Microbiote	- 11 -
2.1.1	Définition du microbiote.....	- 13 -
2.1.2	Définition du microbiome.....	- 13 -
2.1.3	Analyse du microbiote.....	- 14 -
2.1.3.1	Analyse des données	- 15 -
2.1.3.1.1	<i>Diversité Alpha</i>	- 15 -
2.1.3.1.2	<i>Diversité Bêta</i>	- 16 -
2.1.4	Description du microbiote oral	- 17 -
2.1.5	Composition et Fonctions	- 19 -
2.1.5.1	Biofilm	- 22 -
2.1.5.1.1	<i>Biofilm Supra-Gingival</i>.....	- 22 -
2.1.5.1.2	<i>Biofilm sous-gingival</i>	- 23 -
2.2	Microbiote Parodontal et Tissus parodontaux : une interrelation	- 24 -
2.2.1	Introduction	- 24 -
2.2.1.1	Le parodonte	- 24 -
2.2.1.1.1	<i>Le Parodonte superficiel</i>.....	- 25 -
2.2.1.1.2	<i>Le Parodonte profond</i>	- 25 -
2.2.1.2	Le microbiote parodontal.....	- 26 -
2.2.1.2.1	<i>Définition et Composition</i>.....	- 26 -
2.2.2	La maladie parodontale : Dysbiose du microbiote parodontal	- 26 -
2.2.2.1	Définitions	- 27 -
2.2.2.2	Épidémiologie.....	- 29 -
2.2.2.3	Physiopathologies des maladies parodontales	- 30 -
2.3	La Salive et le Microbiote salivaire	- 31 -
2.3.1	Définition	- 31 -
2.3.1.1	La salive	- 31 -
2.3.1.2	Le microbiote salivaire	- 31 -
2.3.2	Composition	- 32 -
2.3.2.1	La salive	- 32 -
2.3.2.1.1	<i>Le débit salivaire</i>	- 33 -
2.3.2.2	Le microbiote salivaire	- 34 -
2.3.3	Les fonctions de la salive	- 35 -
2.3.3.1	Propriétés Physico chimiques.....	- 35 -
2.3.3.2	Propriétés antibactériennes	- 36 -
2.3.4	Conclusion sur la salive et son microbiote.....	- 36 -
3	LIEN ENTRE MICROBIOTE ORAL ET DIABETE	- 38 -
3.1	Introduction	- 38 -

3.2	Le rôle du microbiote oral dans le Diabète	39 -
3.2.1	Le diabète	39 -
3.2.1.1	Définition.....	39 -
3.2.1.2	Épidémiologie.....	40 -
3.2.1.3	Physiopathologie du diabète : Inflammation – Microbiote – Réaction immunitaire	41 -
3.2.1.3.1	<i>Les troubles de sécrétion de l'insuline</i>	41 -
3.2.1.3.2	<i>Mécanismes moléculaires de l'altération de l'insuline</i>	42 -
3.2.1.3.3	<i>Conséquences de l'insulino-résistance</i>	42 -
3.2.1.3.4	<i>Un nouveau paradigme de l'Insulino-Résistance</i>	43 -
3.2.1.3.5	<i>Autres cellules impliquées dans l'insulino-résistance</i>	45 -
3.2.2	Le lien diabète-microbiote oral	46 -
3.2.2.1	Physiologie de l'inflammation chronique de « bas grade » : Quels mécanismes engendrent des désordres locaux et systémiques ?.....	47 -
3.2.2.2	quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires de cette inflammation chronique ?.....	48 -
3.2.2.2.1	<i>Le principe de la réaction inflammatoire</i>	48 -
3.2.2.3	Les principaux médiateurs de l'inflammation.....	49 -
4	RESULTATS EXPERIMENTAUX	52 -
4.1	Résultats expérimentaux (I)	53 -
4.1.1	Introduction	54 -
4.1.2	Méthodes	55 -
4.1.2.1	Collecte des données.....	56 -
4.1.2.2	Caractéristiques médicales et sociodémographiques.....	56 -
4.1.2.3	Caractéristiques de santé bucco-dentaire.....	56 -
4.1.2.4	Analyse du microbiote oral.....	57 -
4.1.2.5	Gestion et analyse des données.....	57 -
4.1.3	Résultats	58 -
4.1.3.1	Caractéristiques de la cohorte.....	59 -
4.1.3.2	Santé bucco-dentaire.....	59 -
4.1.3.3	Analyses.....	60 -
4.1.3.3.1	<i>Analyse de la composition microbienne taxonomique et fonctionnelle</i>	60 -
4.1.3.3.2	<i>Analyse multivariée</i>	65 -
4.1.4	Discussion	69 -
4.1.5	Conclusions	70 -
4.2	Résultats Expérimentaux (II)	72 -
4.2.1	Introduction	73 -
4.2.2	Matériels et Méthodes	74 -
4.2.2.1	Critères de conception et d'admissibilité à l'étude.....	74 -
4.2.2.2	Collecte des données.....	75 -
4.2.2.3	Caractéristiques médicales et sociodémographiques.....	75 -
4.2.2.4	Caractéristiques de santé bucco-dentaire.....	76 -
4.2.2.5	Prélèvement salivaire.....	76 -
4.2.2.6	Analyse du microbiote oral.....	76 -
4.2.2.6.1	<i>Culture bactérienne</i>	76 -

4.2.2.6.2	<i>Analyse taxonomique du microbiote oral</i>	- 77 -
4.2.2.7	Analyses Biochimiques	- 77 -
4.2.2.8	Gestion et Analyse des Données	- 77 -
4.2.2.8.1	<i>Pipeline bio-informatique</i>	- 77 -
4.2.2.9	Analyses Statistiques	- 78 -
4.2.2.10	Types d'analyses effectuées.....	- 79 -
4.2.3	Résultats	- 79 -
4.2.3.1	Caractéristiques des participants	- 79 -
4.2.3.2	Santé bucco-dentaire	- 80 -
4.2.3.3	Analyses biologiques	- 80 -
4.2.3.3.1	<i>Comparaison entre à jeun et nourri</i>	- 80 -
4.2.3.3.2	<i>Comparaison entre hommes et femmes à l'état à jeun et nourri</i>	- 81 -
4.2.3.4	Analyse de la composition taxonomique du microbiote oral.....	- 81 -
4.2.4	Discussion	- 88 -
4.3	Résultats expérimentaux (III)	- 93 -
4.3.1	Introduction	- 94 -
4.3.2	Matériels et Méthodes	- 96 -
4.3.2.1	Animaux.....	- 96 -
4.3.2.2	Régime.....	- 98 -
4.3.2.3	Validation du modèle	- 98 -
4.3.2.3.1	<i>Analyses radiographiques</i>	- 98 -
4.3.2.3.2	<i>Analyses histologiques</i>	- 99 -
4.3.2.4	Analyses des paramètres métaboliques.....	- 99 -
4.3.2.4.1	<i>Test de tolérance au glucose en intra-péritonéal</i>	- 99 -
4.3.2.4.2	<i>Mesure pondérale</i>	- 99 -
4.3.2.5	Analyses de l'inflammation	- 99 -
4.3.2.5.1	<i>Numération de la formule sanguine (NFS)</i>	- 99 -
4.3.2.5.2	<i>Cytométrie en flux</i>	- 100 -
4.3.2.6	Analyses statistiques	- 100 -
4.3.3	Résultats	- 101 -
4.3.3.1	formation d'une lésion péri-apicale (LPA)	- 101 -
4.3.3.2	Effet sur le plan métabolique	- 103 -
4.3.3.3	Effet sur le plan immuno-inflammatoire	- 105 -
4.3.3.4	Autres analyses et corrélations	- 107 -
4.3.4	Discussion et perspectives	- 109 -
4.3.4.1	Discussion.....	- 109 -
4.3.4.2	Perspectives.....	- 112 -
5	PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES	- 116 -
6	CONCLUSION	- 120 -
7	ANNEXES 1 : TABLEAUX	- 122 -
8	ANNEXES 2 :	- 132 -
	FIGURES SUPPLEMENTAIRES	- 132 -
9	BIBLIOGRAPHIE	- 136 -
10	ANNEXES : LES TROIS ARTICLES PUBLIES	- 153 -

1 INTRODUCTION

Cette année 2021, où la majorité de l'humanité est masquée, nous rappelle, si besoin est, l'importance de la bouche dans la communication. Nous savons que la cavité buccale joue des rôles clefs dans l'alimentation et dans la détermination du goût, ce que nous connaissons moins bien c'est son rôle majeur dans l'équilibre microbien de l'organisme appelé « eubiose ».

La bouche abrite un ensemble microbien composé majoritairement de bactéries et dénommé le microbiote oral. En cas de déséquilibre au sein de ce microbiote, appelé « dysbiose », la bouche joue alors un rôle néfaste, avec la dissémination de bactéries et l'entretien de pathologies buccales. Cependant ce microbiote oral n'a pas uniquement une fonction locale, car depuis quelques années nous savons que notre bouche, à travers son microbiote, communique intensément avec l'ensemble de notre corps. Ainsi le microbiote oral devient un marqueur de notre santé générale via son activité systémique.

L'objectif de cette thèse est d'identifier l'impact du microbiote oral et de ses effecteurs bactériens, dans notre santé générale, notamment sur les désordres métaboliques au cours du contrôle glycémique.

Dans un premier temps, nous analyserons les paramètres buccaux et le microbiote d'un groupe ciblé de sportifs de haut niveau, les joueurs de rugby professionnels de l'équipe de Colomiers et nous les comparerons à un groupe témoin. Nous proposerons ainsi des conclusions sur la relation entre leur équilibre bucco-dentaire et leur microbiote oral au cours de la pratique du sport de haut niveau.

Dans la deuxième partie, nous étudierons par quels mécanismes moléculaires le microbiote oral contribue à la régulation glycémique au cours du jeûne et après une prise alimentaire. Nous analyserons les indices cliniques buccaux, la salive et le microbiote dans un groupe d'hommes et de femmes. L'analyse montre des variations au sein de la salive et du microbiote entre l'état à jeun et nourri révélant donc une signature buccale qui peut être considérée comme un des « biomarqueurs » de la glycémie sanguine. Ces indices peuvent nous guider pour le diagnostic et la pratique d'une « médecine personnalisée ».

Dans la troisième partie, les résultats de notre équipe montrent un candidat bactérien *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) associé à l'insulino résistance. Notre objectif est donc d'identifier par quels mécanismes moléculaires *Pg* contribue-t-il à l'insulino résistance au cours du diabète de type 2. Nous avons mis en évidence le métafacteur LPS de *Pg* et la voie immunitaire des lymphocytes TH17 comme acteurs des désordres métaboliques induits par cette bactérie *Porphyromonas gingivalis*. Ce travail a été réalisé grâce à un modèle de lésions péri apicales chez une souris immuno compétente.

L'ensemble de notre thèse souligne l'importance de l'étude de la cavité buccale dans le diagnostic de l'état de santé d'un individu. Cette possibilité de diagnostic nous « éclaire » sur le rôle de prévention qu'il serait envisageable de réaliser en étudiant ce microbiote oral à la suite d'un simple prélèvement salivaire.

Les prémices de ces concepts de prévention et de médecine personnalisée étaient déjà introduites il y a plus de cent ans par un grand éclairer, Thomas Edison (1847 – 1931) :

« The doctor of the future will give us no medicine, but will interest her or his patients in the care of the human frame, in a proper diet, and in the cause and prevention of disease. »

2 LE MICROBIOTE ORAL

La résidence du microbiote oral se limite à la cavité buccale délimitée au-dessus par le palais dur ou raphé palatin, au fond par le palais mou et le pharynx, latéralement par les joues, sur le devant par les lèvres et enfin sur le dessus par la langue, les dents seul tissus dur de la bouche encerclent cet espace oral (**Figure 1A**).

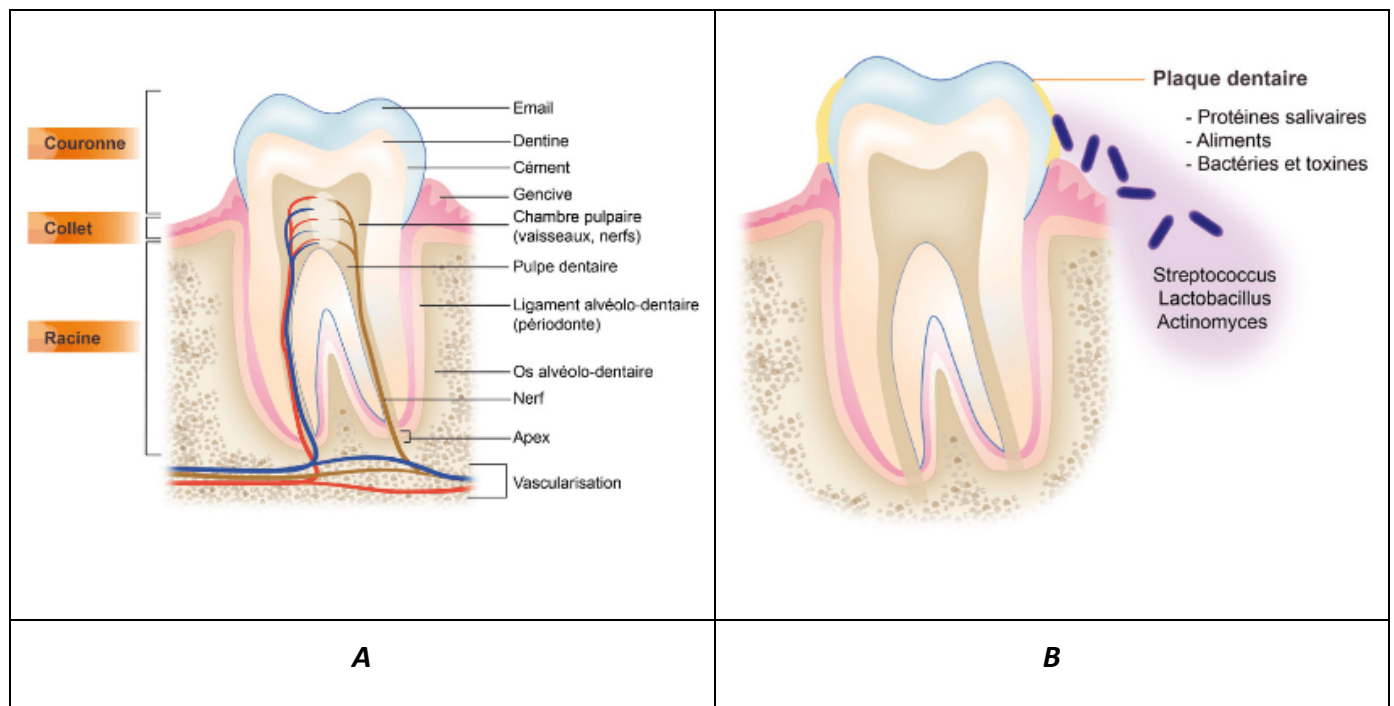


Figure 1: Représentation schématique d'une dent (A)

Représentation schématique d'une dent avec la plaque dentaire (B)

<https://www.sante-sur-le-net.com>

2.1 INTRODUCTION SUR LE MICROBIOTE

Le monde des microorganismes a été découvert au XVII^e siècle quand le Hollandais Antoine van Leeuwenhoek observe les micro-organismes à l'aide de son microscope. Il fournit ainsi l'une des plus grandes contributions à la biologie, avec l'émergence des domaines de la microbiologie et de la bactériologie.

Les interactions entre l'homme et les micro-organismes (microbes) sont complexes et variées. Elles sont aussi bien négatives dans les cas de pathologies, que positives dans le cas de la consommation alimentaire, de sa fermentation et de l'apport en vitamines (1). Chez un être humain en bonne santé, il y a plus de cellules microbiennes (100 milliards) que de cellules humaines. On pourrait presque se demander qui est l'hôte de qui ?

La vie humaine s'accompagne de communautés microbiennes spécifiques de sa niche écologique nommées le « microbiote », et de l'ensemble de ses gènes, nommé le « microbiome ». De nombreux organes humains comme la bouche, la peau, l'intestin ou les poumons possèdent un microbiote complexe, qui varie avec l'âge et les événements de la vie, et qui est différent de ceux des autres organes. Ces divers microbiotes ont un rôle que ce soit local ou à distance sur la santé et l'équilibre d'un individu ainsi que dans le développement de pathologies.

Le microbiote peut donc se définir comme un ensemble de micro-organismes qui regroupe des bactéries, des levures et des virus. On peut distinguer deux populations différentes : une flore commensale jouant un rôle bénéfique sur la santé générale et une flore dite « pathogène » liée au développement de maladies.

Il est essentiel de réussir à maintenir un équilibre entre ces populations afin qu'elles puissent cohabiter. Nous appelons cet état « eubiose ». On parlera de « dysbiose » en cas de déséquilibre de la biodiversité de la flore microbienne qui peut se traduire par une diminution des bactéries présentes, ou une augmentation des bactéries pathogènes notamment des bactéries à Gram négatif, mais plus généralement une baisse de la diversité.

Si les bactéries de la flore commensale buccale jouent un rôle protecteur, d'autres bactéries vont, en revanche, provoquer des caries ou des réactions inflammatoires locales telles que les gingivites et des réactions à distance lors de la dysbiose du microbiote. Chaque individu joue un rôle dans le maintien de la bonne qualité de son propre microbiote.

Il faut faire attention à la définition de la dysbiose d'un microbiote, comme le souligne très justement un article de mars 2021 de Shaodong Wei et al. (2). La dysbiose du microbiote intestinal qu'elle prend pour exemple, n'est pas un état bien défini et l'auteur réalise une synthèse des différentes méthodes permettant de définir un état dysbiotique.

On peut considérer aujourd'hui que les humains sont des « supers organismes », concept, développé par W. Morton Wheeler en 1917 (3), qui montre que les différents organismes maintiennent un échange permanent et bénéfique.

Notre intestin possède, en quantité, le microbiote le plus important de l'organisme, ce qui lui confère un rôle majeur dans le maintien de la santé générale. De plus, l'intestin présente le deuxième système nerveux (système nerveux entérique) de l'organisme en nombre de neurones lui conférant l'appellation de « deuxième cerveau ». En effet une grande partie des informations du système nerveux entérique est en très étroite relation avec le microbiote intestinal qui lui est en lien avec le milieu buccal (4). La cavité buccale est la « porte d'entrée » la plus importante pour les microbes, au début du tractus digestif (5). Elle abrite le deuxième microbiote de notre organisme (6) et nous nous proposons d'analyser ici sa composition et son rôle dans la santé générale.

2.1.1 DEFINITION DU MICROBIOTE

La définition des termes « microbiote et microbiome » a été un sujet de discussion intense dans la communauté scientifique (voir Berg et al, 2020) (7) . Dans notre thèse, nous parlerons de **microbiote** pour désigner l'ensemble des espèces microbiennes (bactéries, microchampignons, protistes, virus, levures) présents dans un environnement défini d'un hôte (animal ou végétal). Une étude récente de Sender (8) évalue le microbiote total d'un individu à environ 39 000 milliards de bactéries, un chiffre qui est très proche du nombre de cellules du corps humain avec environ une moyenne de 30 000 milliards de cellules.

2.1.2 DEFINITION DU MICROBIOME

Nous parlerons de **microbiome** quand il s'agira de l'ensemble des gènes présents dans ce microbiote (9). Le terme microbiome a été introduit en 2001 par le généticien et microbiologiste américain Joshua Lederberg (10) afin d'intégrer la notion d'une communauté écologique comprenant symbiotes, commensaux et pathogènes partageant l'espace corporel humain, et pour souligner leurs fonctions déterminantes pour la santé et lors de maladies.

Le terme microbiome fait référence au mot « génome », qui désigne l'ensemble du matériel génétique d'une espèce codé dans son Acide Désoxyribonucléique (ADN), ou son Acide Ribonucléique (ARN) pour certains virus.

2.1.3 ANALYSE DU MICROBIOTE

Ces dernières années ont vu l'émergence des technologies de séquençages à haut débit permettant une analyse très précise et individuelle des génomes. C'est ainsi que l'analyse complète des microbiotes est devenue possible soutenue aussi par les développements de la bio-informatique et la métagénomique. (Introduction à la métagénomique par Schutz S. (<https://dridk.me/metagenomique.html>)).

Cette technique d'analyse du métagénome permet de répondre à de nombreuses interrogations sur des maladies comme le diabète, les maladies cardio-vasculaires, et la maladie d'Alzheimer...

La métagénomique est une technique de séquençage et d'analyse du génome d'un milieu donné. Une analyse classique nous renseigne sur la composition générale d'un microbiome, des espèces présentes, de leurs abondances et de leurs diversités (alpha et bêta). Une des représentations les plus utilisée est le LEfSe ou cladogramme, exemple **Figure 2** représentant les bactéries buccales significativement différentes entre les deux groupes d'individus, ici : à jeun et nourris.

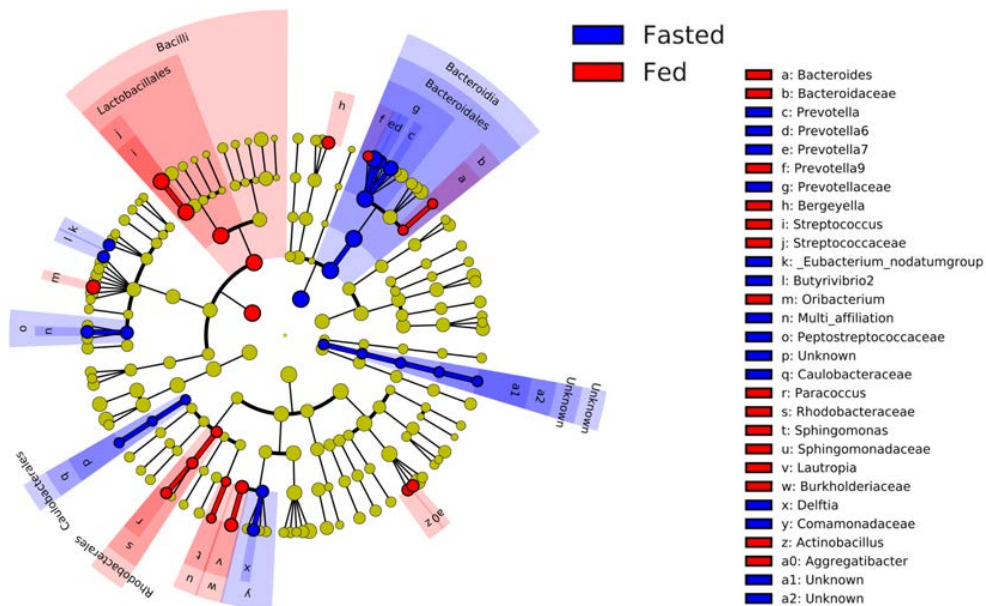


Figure 2: LEfSe ou cladogramme représentant le microbiote de deux groupes d'individus dans les conditions alimentaires à jeun puis nourris (11)

2.1.3.1 ANALYSE DES DONNEES

2.1.3.1.1 Diversité Alpha

La diversité Alpha est « une mesure indiquant la diversité du microbiote d'un échantillon unique » selon le nombre d'espèces et leur abondance. Ces derniers constituent les deux critères de l'indice de Shannon, chaque indicateur répondant à un problème spécifique. L'indice Chao1, lui estime « le nombre total d'espèces dans l'environnement à partir du nombre d'espèces dans l'échantillon ».

Il existe aussi d'autres indices, comme l'indice de Simpson (mesure de la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce dans une population), de Fisher ou l'indice ACE (Abundance-based Coverage Estimator). Ainsi pour l'indice ACE « plus les probabilités sont hétérogènes, plus le nombre d'espèces non observées sera grand », donnant une valeur supérieure à Chao1.

Le graphique ci-dessous (**Figure 3**), extrapolé des données de la figure 2, est un exemple montrant les différences d'alpha diversité du microbiote oral en fonction du statut nutritionnel.

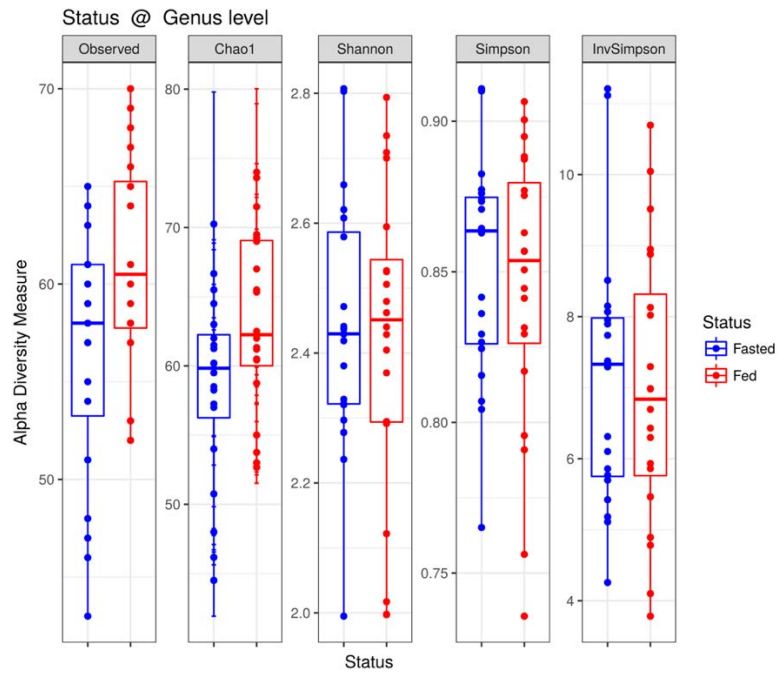


Figure 3: Diversité Alpha du microbiote oral en fonction du régime alimentaire (11)

2.1.3.1.2 Diversité Bêta

La diversité Bêta consiste à mesurer la diversité des espèces entre les échantillons. On procède le plus souvent à l'analyse multivariée de la matrice des OTUs (Unités Taxonomiques Opérationnelles qui regroupent des individus phylogénétiquement proches) en ayant recours aux méthodes d'ordinations comme l'Analyse en Composantes Principales (PCA). La représentation de cette diversité bêta sous forme d'ellipse (**Figure 4**), permet la visualisation directe des clusters obtenues en positionnant nos individus selon deux axes majeurs représentant les deux paramètres les plus déterminants pour différencier ces deux groupes.

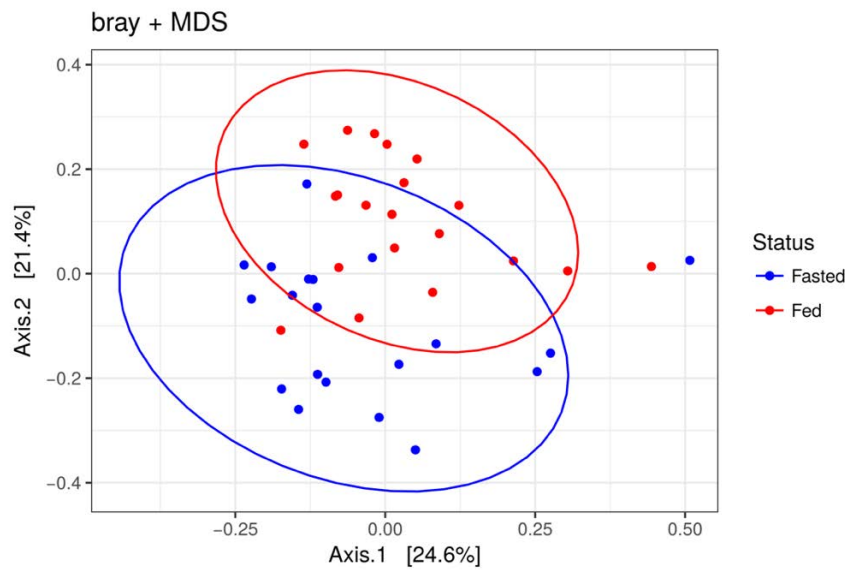


Figure 4: Représentation en ellipse de la Bêta diversité du microbiote oral selon le statut nutritionnel (11).

2.1.4 DESCRIPTION DU MICROBIOTE ORAL

La photo ci-dessous prise au microscope électronique à balayage après coloration des bactéries donne une vision spectaculaire d'un microbiote oral. Nous visualisons sur cette **Figure 5**, les *Cocci* en rond, les *Baccili* et enfin les *Spirilli* plus allongés sous forme d'un biofilm.

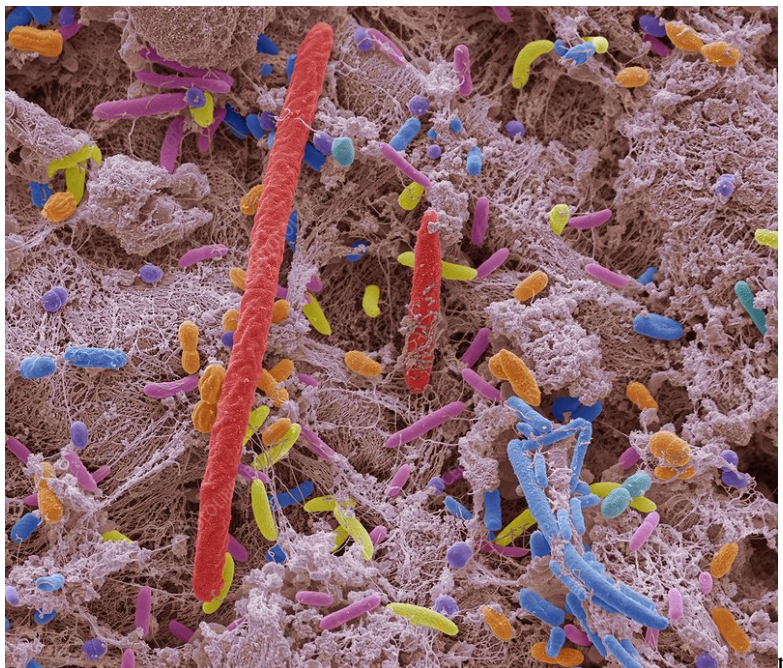


Figure 5: Microbiote oral vu sous microscopie électronique à balayage après coloration des bactéries. (<http://www.gettyimages.com>).

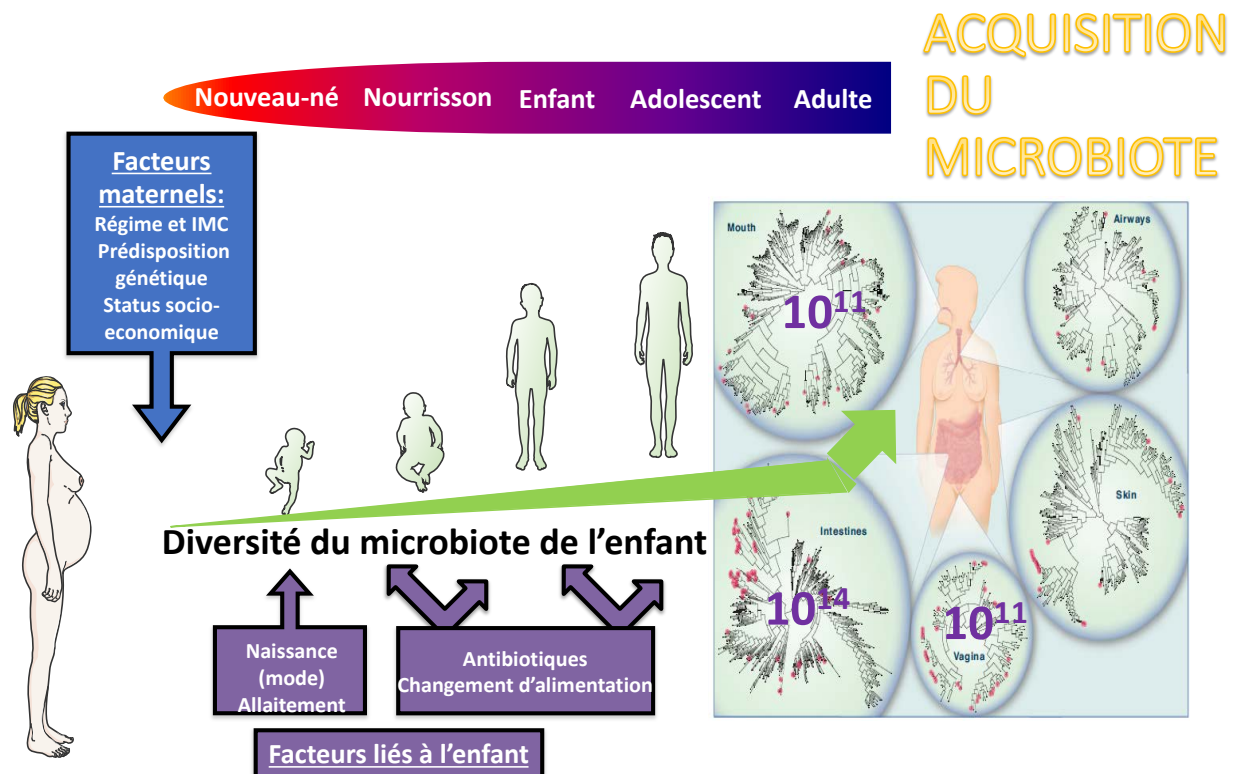
La cavité buccale abrite le deuxième plus grand microbiote de l'organisme (5) et depuis quelques années elle est un sujet d'étude intense (6). Avec plus de 700 espèces différentes identifiées chez l'adulte (12), l'acquisition du microbiote débute dès les premières minutes de la vie au contact du microbiote maternel : de la peau, du vagin et de la bouche. Une étude récente (13) souligne que l'environnement de l'enfant est essentiel à la construction de son microbiote et n'est pas dû uniquement à son hérédité.

En outre, le microbiote maternel a déjà joué un rôle important dans le neuro-développement du fœtus avant la naissance (14). Ce microbiote oral sera également soumis à une grande réorganisation lors de l'éruption dentaire (temporaire et définitive) (15). En effet l'apparition des dents va permettre aux bactéries d'accéder à un nouvel habitat et de créer le parodonte avec son microbiote.

Après la naissance, les premières bactéries établies sont les bactéries anaérobies du genre *Streptococcus* provenant du contact avec la microflore maternelle. Dans un deuxième temps, des bactéries anaérobies strictes, telles que le genre *Veillonellae* (*Firmicutes*) et le *Phylum Fusobacteria* (16), viennent coloniser la bouche.

La composition de cette microflore varie en fonction des événements de la vie: la diversification des aliments, les changements hormonaux (puberté, période menstruelle, grossesse), la prise de médicaments, y compris des antibiotiques et bien sûr en fonction de l'âge.

2.1.5 COMPOSITION ET FONCTIONS



Serino M, ..., Blasco-Baqué V. *Pediatr Obes.* 2016

Figure 6 : Acquisition du microbiote lié aux facteurs maternels et à l'enfant (17)

Le microbiote oral est acquis dès la naissance en transmission verticale de la mère à l'enfant. L'acquisition de ce microbiote, et sa diversité sont étroitement liées au mode d'accouchement, et d'allaitement : les *Lactobacilles* sont dominants chez les enfants nourris au sein (**Figure 6**). La particularité du microbiote oral est liée aux différents types de muqueuses et surtout à la présence des dents qui constituent la seule surface non desquamante du corps humain. Cette dernière surface permet de créer des biofilms, sorte de refuges uniques pour les micro-organismes en s'accumulant à la surface des dents créant ainsi la plaque dentaire (18). Il est donc à noter que les bactéries de la bouche peuvent adopter des modes de vie totalement différents : soit à l'état planctonique, quand les micro-organismes sont présents dans le liquide de ce milieu buccal, soit comme on vient de le voir attachés à la surface dure dentaire en constituant un biofilm.

L'imagerie en microscopie confocale à balayage laser a permis la visualisation en 3D du microbiote bactérien du biofilm. Cette visualisation est possible grâce aux colorants qui se fixent aux protéines spécifiques des bactéries du biofilm (19).

Socransky a regroupé les espèces bactériennes formant le biofilm en cinq complexes majeurs (20) (**Figure 7**) :

1. Un complexe composé de *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* et *Treponema denticola* dans un groupe étroitement lié.
2. Le 2ème complexe composé d'un groupe central étroitement lié comprenant des membres des sous-espèces *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* et *Peptostreptococcus micros*. Les espèces associées à ce groupe comprenaient : *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* et *Campylobacter gracilis*.
3. Le 3ème complexe se compose de *Streptococcus sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* et *S. intermedius*.
4. Le 4ème complexe est composé de 3 espèces de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans sérotype α* .
5. Le 5ème complexe est composé de *Veillonella parvula* et *Actinomyces odontolyticus*, *A. actinomycetemcomitans sérotype β* , *Selenomonas noxia* et *Actinomyces naeslundii* *genospecies 2*.

Une personne en bonne santé présente essentiellement les espèces *Actinomyces* (complexe bleu) et en quantités inférieures, les espèces *Streptococcus* (complexe jaune) et *Veillonella* (complexe violet) (**Figure 7**) (20).

Les complexes orange (*Fusobacterium* et *Prevotella*) et rouge (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) associés à la maladie parodontale ne représentent même pas 4% des bactéries d'un sujet sain. Ainsi une augmentation de ces bactéries, majoritairement Gram négatif, est à l'origine d'une dysbiose de ce microbiote oral (20).

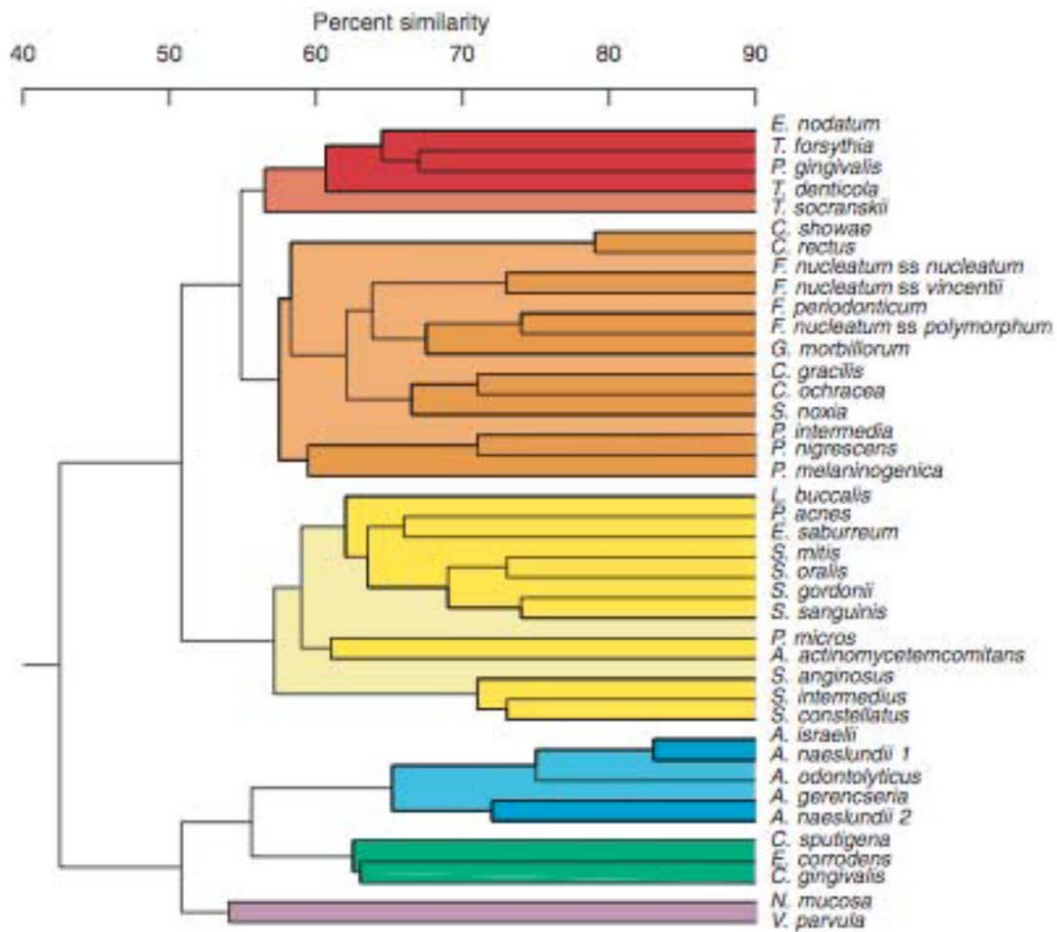


Figure 7: Complexes bactériens selon Socransky (20)

Le 1er complexe s'est lié de façon frappante aux mesures cliniques de la maladie parodontale, en particulier la profondeur des poches et les saignements, ces paramètres signant la présence de la maladie parodontale.

Par la suite Lovegrove J. (21) a étudié les bactéries associées aux maladies parodontales qui sont principalement des bactéries anaérobies à Gram négatif et peuvent inclure *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *P. micros*, *S. intermedius* et *Treponema sp.*

2.1.5.1 BIOFILM

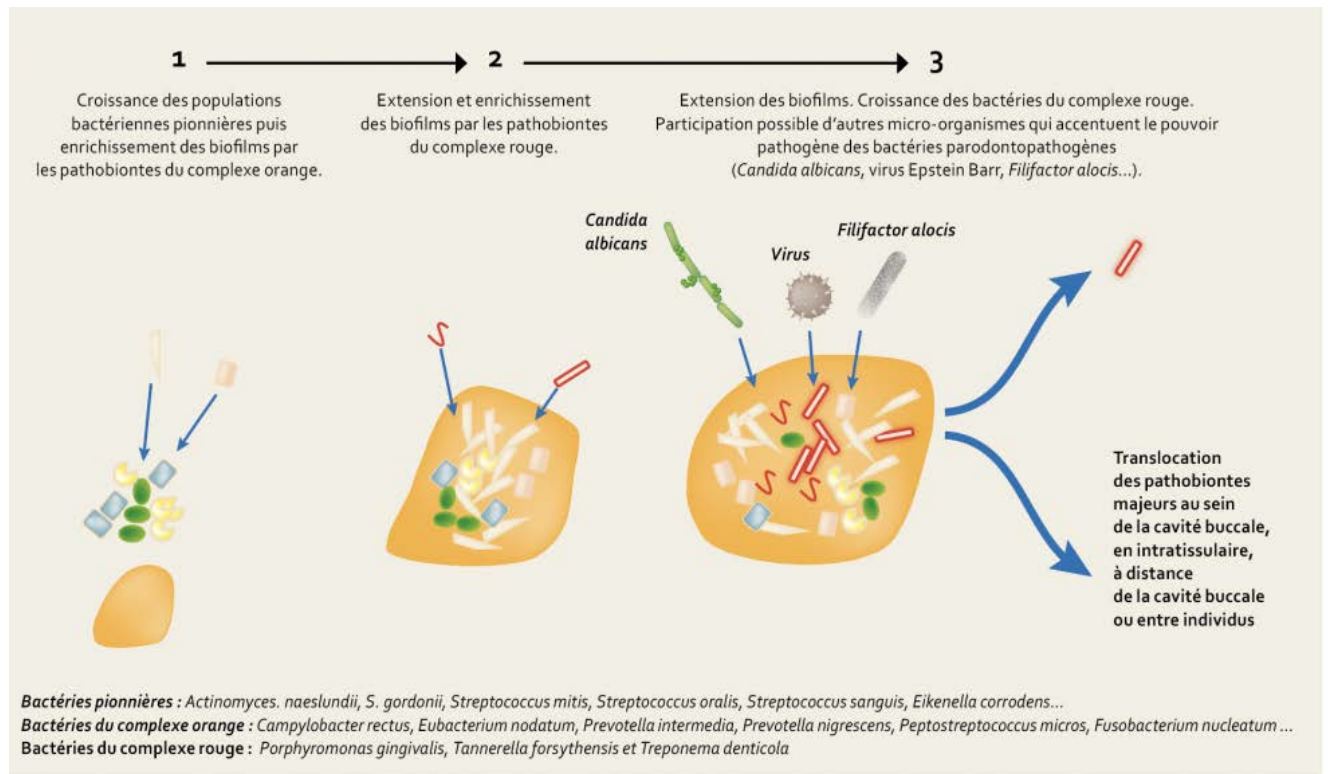


Figure 8 : Représentation de la formation et du développement d'un biofilm jusqu'à sa dissémination dans l'organisme (<https://www.information-dentaire.fr>)

Comme le décrit le schémas ci-dessus (**Figure 8**), il existe des bactéries pionnières comme les *Streptococcus* notamment et *Actinomyces* qui vont se développer jusqu'à l'arrivée de pathobiontes (membres opportunistes normalement sous-dominants de la flore commensale) du complexe orange (*Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum*). Enfin l'arrivée des bactéries du complexe rouge, au sein de ce biofilm, entraîne sa virulence. La translocation de ces bactéries à distance est à l'origine de complications systémiques (22).

2.1.5.1.1 Biofilm Supra-Gingival

Le biofilm de cette plaque supra-gingivale est formé tout d'abord sur la surface dentaire. Les bactéries qui le composent sont essentiellement de type aérobie et anaérobie facultatives à Gram positif et souvent cariogènes comme les *Streptococcus sobrinus*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *Lactobacillus sp.*, *Actinomyces sp.*, *A. viscosus*) (**voir Figure 9**) (23).

La composition bactérienne de ce biofilm évolue parallèlement à sa formation sur les surfaces dentaires, surfaces supra-gingivales engendrant la prolifération et la sélection

bactérienne qui sont à l'origine soit de la déminéralisation acide des tissus durs dentaires soit de l'inflammation de la gencive.

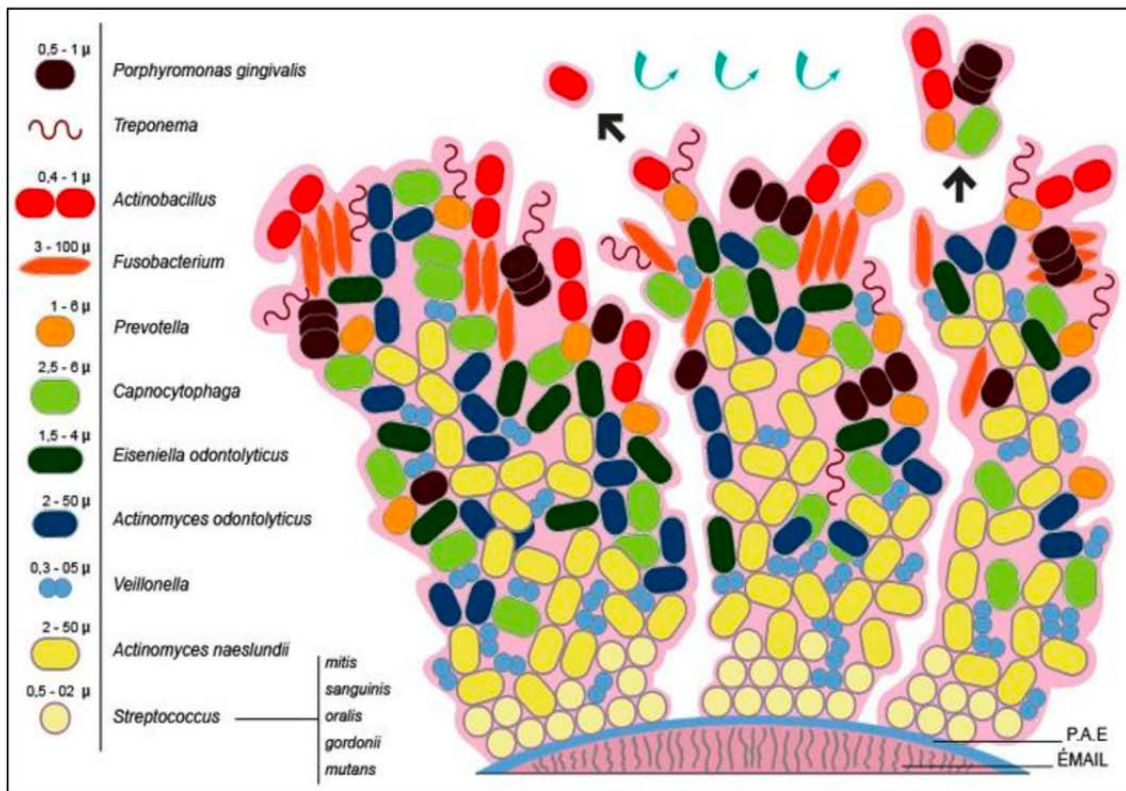


Figure 9: Composition schématique d'un biofilm (24)

2.1.5.1.2 Biofilm sous-gingival

Dans ce biofilm, les bactéries sont de type anaérobie strict à Gram négatif, vivant exclusivement au fond des poches parodontales et dans le sillon gingival. Ces micro-organismes sont à l'origine des maladies parodontales. Chez un patient atteint de parodontite, les espèces dominantes appartiennent au complexe d'orange (**Figure 7**) elles sont de types : *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*... (25).

2.2 MICROBIOTE PARODONTAL ET TISSUS PARODONTAUX : UNE INTERRELATION

2.2.1 INTRODUCTION

Cette coupe schématique (**Figure 10**) permet de visualiser les différents tissus qui composent la dent.

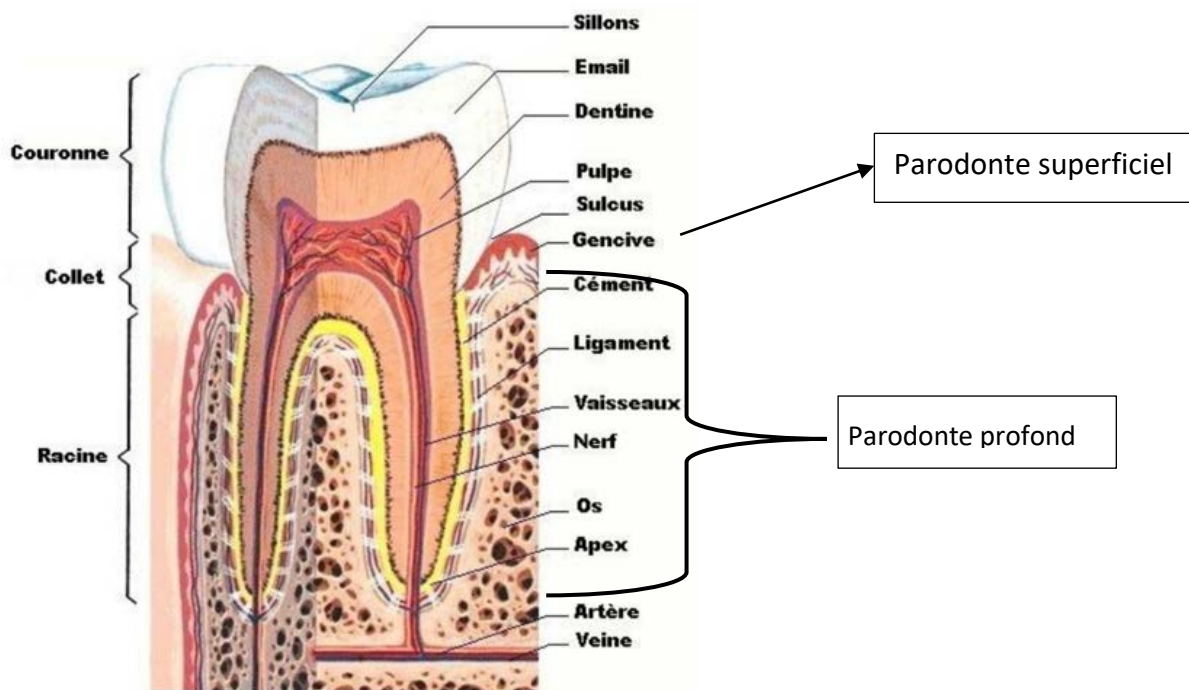


Figure 10 : Coupe schématique d'une dent et de ses composants par le Dr Albert Hauteville (Conseil Dentaire Dr. Hauteville)

2.2.1.1 LE PARODONTE

Le **parodonte** représente les différents tissus de soutien de la dent.

Il est constitué :

- ✓ d'un parodonte superficiel : la gencive,
- ✓ d'un parodonte profond composé du cément, du ligament desmodontal et de l'os alvéolaire.

2.2.1.1.1 Le Parodonte superficiel

Le parodonte superficiel est un tissu kératinisé avec un tissu conjonctif riche en fibres de collagène. Il a une fonction de protection des autres tissus environnementaux (26).

La gencive possède plusieurs mécanismes de défenses : la première est la constitution d'une barrière mécanique vis-à-vis des bactéries et autres fluides oraux, la seconde est due à la présence de nombreuses cellules de défense jouant un rôle dans la réaction immunitaire en cas d'agression chimique ou mécanique (27).

Pour réaliser le lien de jonction entre les tissus du parodonte profond et superficiel, il existe un épithélium sulculaire empêchant le passage des micro-organismes de la cavité buccale vers les tissus de soutien (26). Le sillon entre la dent et la gencive, appelé sulcus, renferme un fluide contenant à la fois un mélange de micro-organismes, de débris cellulaires et d'électrolytes. L'évacuation de ce fluide gingival, composé essentiellement de déchets, suffit pour la protection du parodonte profond.

2.2.1.1.2 Le Parodonte profond

Le parodonte profond est constitué de plusieurs éléments : **Le ciment**, qui se construit pendant la formation de la dent, est composé d'un ciment primaire présent avant l'éruption de la dent et d'un ciment secondaire formé après l'éruption. Ce dernier s'appose tout au long de la vie grâce notamment aux cémentoblastes. Il est composé d'une matrice extracellulaire de collagène minéralisé, de protéines et de Facteur de Croissance dérivé du Cément (CGF) (28).

Le ligament desmodontal, à l'inverse du ciment, est vascularisé et innervé. Il est composé d'une matrice extracellulaire composée de fibroblastes, de cellules du système immunitaire mais aussi de vaisseaux sanguins et des nerfs (29). Les fibres constituant ce ligament desmodontal, reliant le ciment de la dent et l'os alvéolaire sont appelées « fibres de Sharpey ». De par son innervation, le ligament desmodontal est responsable de la proprioception de la dent et contribue, par sa vascularisation, à la formation des cémentoblastes.

Le dernier élément du parodonte profond est **l'os alvéolaire** qui constitue nos mâchoires soutenant nos organes dentaires. L'os alvéolaire « naît, vit et meurt » avec la dent (26). Il est composé d'une zone corticale externe et d'une partie trabéculaire interne. Il se renouvelle

tout au long de la vie de la dent par une succession d'appositions et de résorptions du tissu osseux médié par la présence des ostéoblastes, des ostéocytes et des ostéoclastes.

2.2.1.2 LE MICROBIOTE PARODONTAL

2.2.1.2.1 Définition et Composition

Le microbiote parodontal apparaît lors de l'éruption des premières dents. Il est particulier par rapport aux autres microbiotes car il associe des bactéries planctoniques et des bactéries en biofilm comprises dans une matrice d'exopolysaccharides.

Lors d'une maladie parodontale, ce microbiote parodontal-dysbiotique est composé essentiellement de bactéries à Gram négatif anaérobies stricts comme des bâtonnets ou des bacilles du genre *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* ou *Tannerella* (30).

Intérêt clinique : Le prélèvement bactérien parodontal permet l'analyse qualitative et quantitative des espèces bactériennes présentes dans ce fluide gingival. Il est réalisé à l'aide de petits cônes de papier buvard introduits dans le sulcus quelques secondes pour imprégner des bactéries sur ces pointes de papiers. Ce type d'empreinte permet l'analyse du microbiote parodontal et le diagnostic de l'état dysbiotique à l'origine d'un dérèglement immunitaire entraînant l'apparition de parodontite et autres pathologies systémiques.

2.2.2 LA MALADIE PARODONTALE : DYSBIOSE DU MICROBIOTE PARODONTAL

Le schéma ci-dessous montre les différentes étapes de la maladie parodontale avec l'augmentation en pourcentage de bactérie à Gram négatif lors de la progression de la maladie parodontale (**Figure 11**).

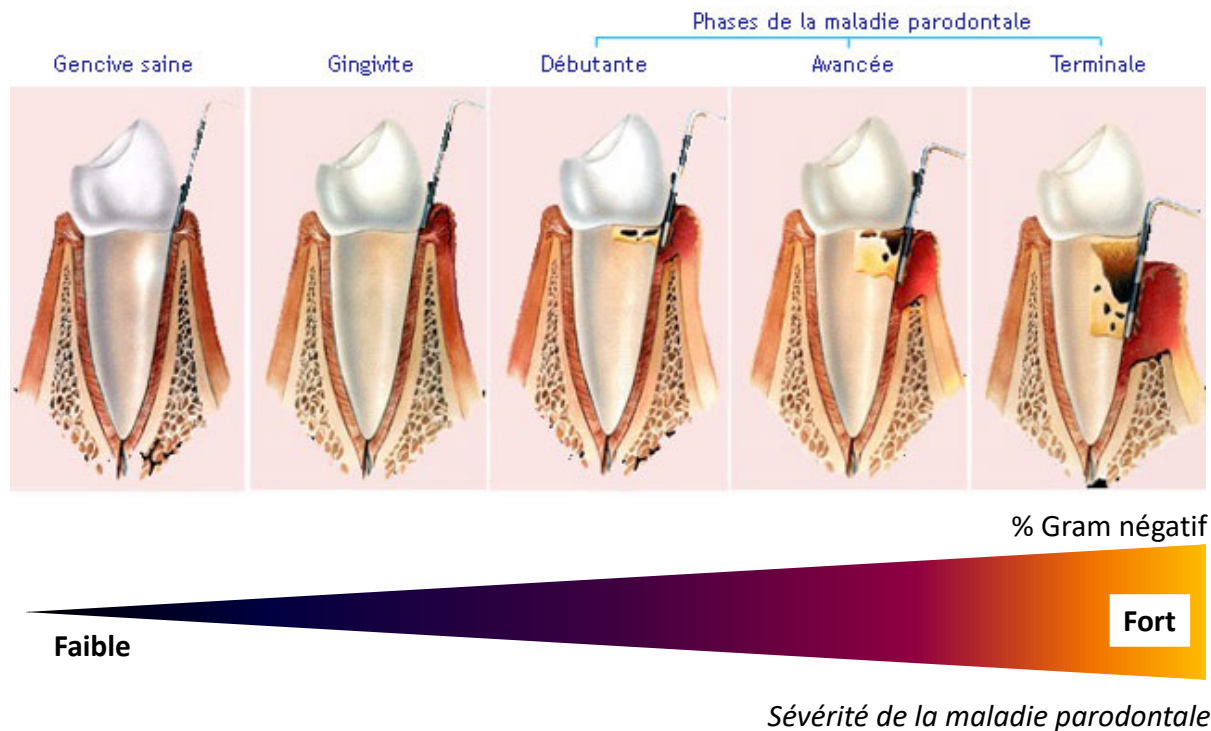


Figure 11 : Les différentes étapes de la maladie parodontale associée à l'augmentation de bactéries à Gram négatif par le Dr Vincent Ronco (Paris) et modifié par M. Minty.

2.2.2.1 DEFINITIONS

Les maladies parodontales sont des maladies buccales à dysbiose bactérienne associée à une inflammation chronique des tissus de soutien de la dent et qui contribuent à une inflammation chronique systémique de bas grade (31). L'origine principale de la maladie parodontale est l'orientation du microbiote parodontal vers une dysbiose au sein de son biofilm, véritable réservoir de bactéries à Gram négatif anaérobies.

Les facteurs orientant vers la dysbiose peuvent être le diabète, le tabagisme, le vieillissement, le stress, la génétique familiale, la mauvaise alimentation (trop de sucre), les différentes étapes de la vie sous influence hormonales, les drogues, les infections virales chroniques, les prescriptions médicales tels que les antibiotiques et les bains de bouche antiseptique... dans les faits, tout ce qui peut perturber l'équilibre de la flore buccale. La prévalence et l'incidence de cette inflammation chronique dépendent des facteurs de risques généraux et locaux du patient.

Il existe différents stades d'évolution de la maladie des tissus de soutien de la dent. Cette évolution est étroitement liée à la réactivité d'intervention du patient. Le premier stade c'est **la gingivite** qui est une inflammation des gencives qui, traitée efficacement par des soins bucco dentaires adaptés, va guérir sans autre impact sur la santé générale. Des programmes de prévention et de dépistage doivent être mis en place de façon à éviter toute récurrence. Si cette gingivite n'est pas traitée à temps, elle va progressivement évoluer vers le second stade qui est **la parodontite ou maladie du parodonte (Figure 12)**. C'est une affection grave qui contrairement à la gingivite est irréversible. On différencie plusieurs étapes dans l'évolution de cette maladie : La parodontite peut être aiguë, dite agressive, chronique et enfin ulcéro-nécrotique (32).

On parlera de **parodontite agressive** en cas de vives douleurs au niveau de la gencive, (ce qui n'est pas toujours le cas) dues à l'infection par des bactéries de tous les tissus de soutien de la dent. Simultanément à la perte osseuse, un réservoir de bactéries s'établit entre la gencive et la dent. Cette inflammation du parodonte entraîne un déchaussement de la dent ou des dents : celles-ci bougent, on parle alors de **parodontite chronique** quand on note une destruction progressive des tissus de soutien et cet état peut progresser de façon très lente sur plusieurs mois voire plusieurs années jusqu'à parler d'ulcération nécrotique. (33)



Figure 12 : Inflammation généralisée avec présence de tartre et de plaque inter-dentaire (crédit photo Dr Thomas Charlotte)

2.2.2.2 ÉPIDEMIOLOGIE

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), entre 10 et 15% de la population mondiale présente une parodontite sévère, dont les causes principales sont la mauvaise ou inexistante hygiène buccale mais aussi d'autres facteurs comme une mauvaise alimentation ou le tabagisme (34).

En France, 40 à 50% de la population adulte souffre de formes modérées à sévères. Les formes les plus sévères de parodontite constituent un réel enjeu de santé publique, et elles sont classées au 6^{ème} rang des maladies chroniques en termes de prévalence. La parodontite chronique affecte principalement les adultes, mais une parodontite agressive peut parfois survenir chez les enfants (35).

En France, la population vieillit ce qui conduit à l'augmentation des personnes traitées pour des maladies graves ou avec des comorbidités du type tumeurs malignes, diabète, maladies coronariennes, cardio-vasculaires, hypertension, obésité... entraînant une augmentation de la prise en charge parodontale, cette dernière devient ainsi un réel enjeu économique.

La prévalence des maladies parodontales varie en fonction : du sexe, les femmes prendraient plus soin de leur bouche et donc présenteraient une meilleure santé buccale que les hommes, du niveau d'éducation, un faible niveau d'éducation est corrélé avec une prévalence de la maladie parodontale. Il existe aussi une corrélation avec l'origine ethnique, mais il est toutefois difficile de montrer si les disparités constatées sont liées à des caractères innés ou à des conditions sociales économiques empêchant l'accès à une alimentation correcte, à la prévention ou aux soins médicaux (31). On note aussi une plus grande prévalence de la maladie dans les pays en voie de développement que dans les pays occidentaux. Le tabagisme, et surtout la nicotine, augmenterait de 2,5 à 6,0 fois le risque de parodontie. Enfin, les effets du stress sont reconnus comme un facteur de risque au niveau de l'attache et de la résorption de l'os alvéolaire. (36)

2.2.2.3 PHYSIOPATHOLOGIES DES MALADIES PARODONTALES

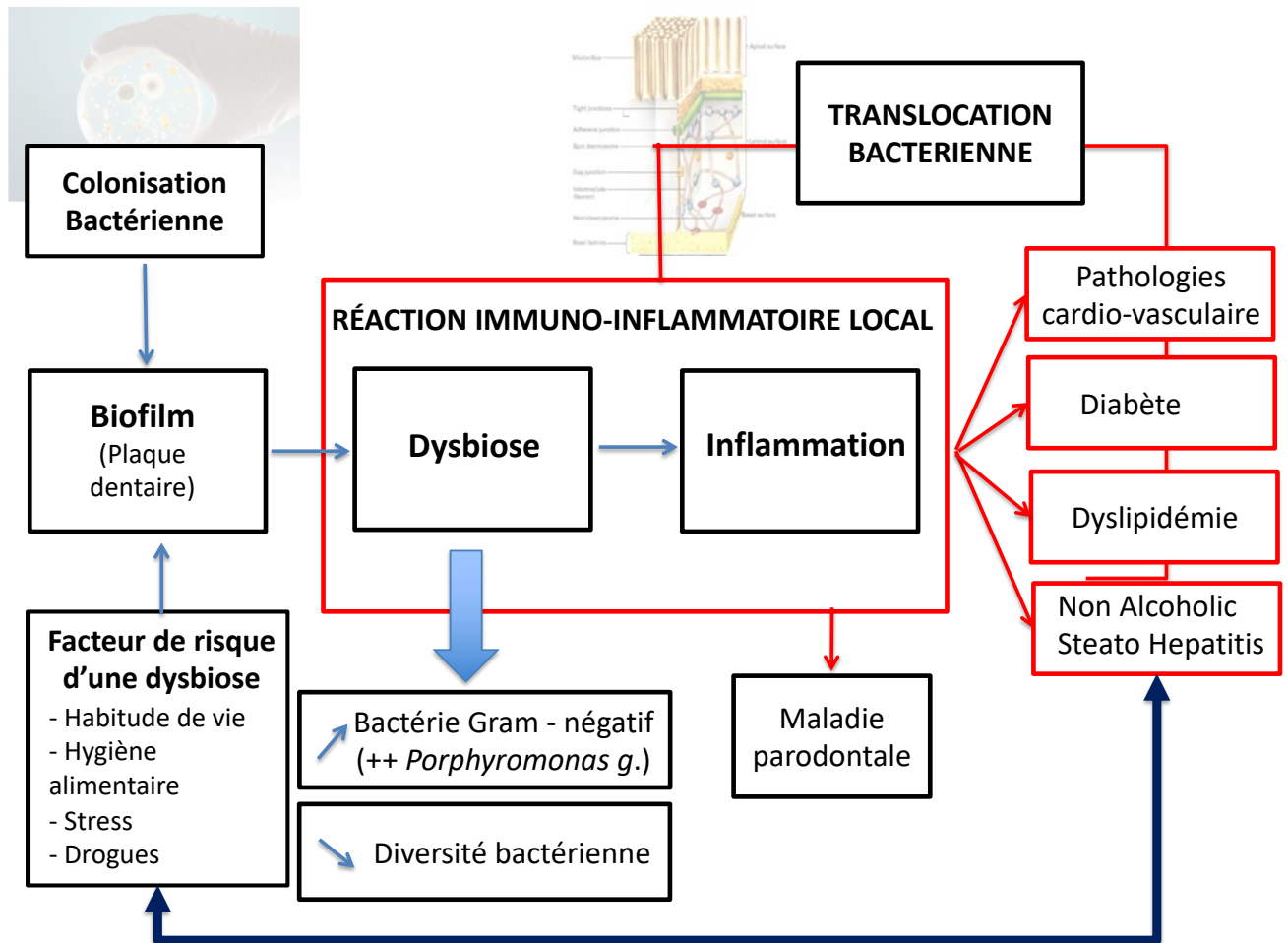


Figure 13: Physiopathologie des maladies parodontales et relations bidirectionnelles avec les pathologies métaboliques

Le schéma ci-dessus (**Figure 13**) décrit le cheminement inéluctable de l'apparition du biofilm jusqu'à l'apparition des maladies inflammatoires si les soins dentaires et l'hygiène buccal ne sont pas respectés. L'initiation et la propagation de la maladie parodontale se font donc par une dysbiose du microbiote oral commensal (plaque dentaire), qui interagit ensuite avec les défenses immunitaires de l'hôte, conduisant à une inflammation chronique et à de multiples pathologies.

En effet les bactéries à Gram négatif, liées à la parodontite qui ont créé la dysbiose, sont associées aux facteurs de virulence classiques tels que les exotoxines, les endotoxines, la *Fimbriae* et la capsule mais aussi à la cascade de produits métaboliques (générés par le

métabolisme anaérobie et protéolytique) des micro-organismes bactériens survivant dans les poches parodontales (31).

En conclusion, le microbiote parodontal et plus généralement le microbiote oral ont donc un rôle très important dans un grand nombre de pathologies infectieuses locales et systémiques (37), (38) comme nous allons le voir.

2.3 LA SALIVE ET LE MICROBIOTE SALIVAIRE

2.3.1 DEFINITION

2.3.1.1 LA SALIVE

La salive est une sécrétion muqueuse exocrine claire et légèrement acide composée à 99% d'eau et de 1% de composés inorganiques, organiques et de protéines (39). La salive entière est un mélange complexe de liquides provenant des glandes salivaires majeures et mineures et du liquide crevicalaire gingival. Elle contient des bactéries orales et des débris alimentaires.

Les contributions en pourcentage des différentes glandes salivaires pendant le flux non stimulé sont les suivantes : 20 % de parotides, 65 % de sous-maxillaires, 7 % à 8 % de sublinguales et moins de 10 % de nombreuses glandes mineures. Lors d'une stimulation de ce flux salivaire la parotide contribue à plus de 50% du total des sécrétions salivaires (40).

2.3.1.2 LE MICROBIOTE SALIVAIRE

Les diverses niches écologiques qui composent le microbiote oral sont constituées essentiellement de tissus dur et mou, mais Marsh P.D et coll. nous montre l'influence majeure de la salive sur ce microbiote (41). En effet la composition de la salive joue un rôle déterminant sur le microbiote par l'intermédiaire d'une cascade de mécanismes liés aux molécules en suspension qui conditionnent la composition du biofilm. Ceci va permettre l'attachement bactérien sur les surfaces buccales. Les composants salivaires tels que les glycoprotéines sont une source de nutrition pour assurer la croissance des bactéries présentes dans la bouche. L'ensemble de ces bactéries agit en synergie, à des concentrations très faible, permettant un équilibre complexe entre le microbiote environnant et la cavité

buccale d'accueil. Un déséquilibre dans l'émission du flux salivaire peut facilement entraîner une dysbiose.

2.3.2 COMPOSITION

2.3.2.1 LA SALIVE

La salive est composée d'une variété d'électrolytes, y compris le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le bicarbonate et les phosphates. On trouve également dans la salive des immunoglobulines, des protéines, des enzymes, des mucines et des produits azotés, tels que l'urée et l'ammoniaque. Ces composants interagissent sur les domaines généraux suivants.

- ✓ Les bicarbonates, les phosphates et l'urée agissent pour moduler le pH et la capacité tampon de la salive (39).
- ✓ Les protéines macromoléculaires et les mucines servent à nettoyer, à agréger et / ou à fixer les microorganismes oraux. Elles contribuent au métabolisme de la plaque dentaire.
- ✓ Le calcium, le phosphate et les protéines agissent ensemble et modulent la déminéralisation et la reminéralisation.
- ✓ Les immunoglobulines, les protéines et les enzymes ont une action antibactérienne.

Les glandes salivaires majeures produisent la plus grande partie du volume de sécrétion et génèrent la teneur en électrolytes de la salive, tandis que les glandes salivaires mineures contribuent avec un faible volume de sécrétion à la production de mucines glycosylées, permettant la détermination du groupe sanguin. Ces glandes salivaires mineures sont actives dans la lubrification des tissus buccaux et dans l'agrégation bactérienne (42) (43) (44) (**Figure 14**).

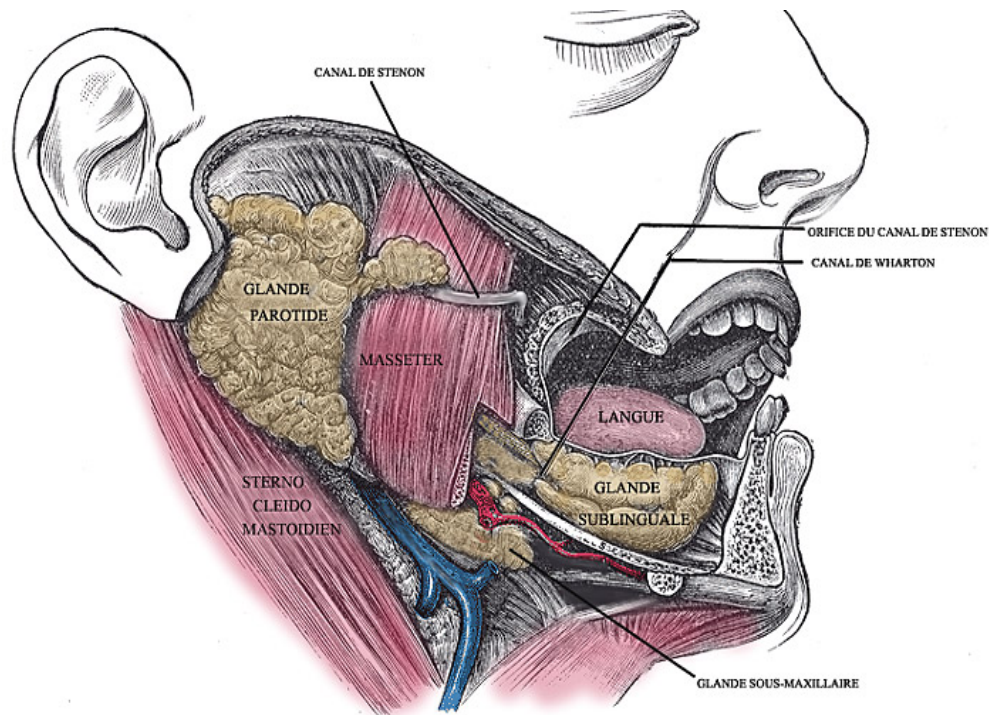


Figure 14: Anatomie des Glandes Salivaires

(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Parotid.png>)

La salive possède des activités anti inflammatoires et anti bactériennes mais contient également de nombreux facteurs de croissance comme Nerve Growth Factor (NGF), Epithelial Growth Factor (EGF), Insulin-Like Growth Factor (IGF) et des cytokines inflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , les InterLeukines (IL) 2, 4, 6, 10, l'InterFéron (IFN)- γ et le Transforming Growth Factor (TGF)- β (45).

2.3.2.1.1 Le débit salivaire

La régulation du débit quotidien sécrété continuellement, entre 1 à 1,5L de salive par jour (46) et (47), est assurée par l'activité des nerfs sympathiques et parasympathiques.

Un débit salivaire insuffisant entraîne deux effets locaux : une préparation réduite des aliments pour la digestion et pour le goût, ainsi qu'une augmentation du risque pour les tissus mous et durs de la bouche de développer une pathologie (48), (49).

Il existe de nombreux facteurs entraînant une diminution du débit salivaire, tels que l'alimentation, les effets secondaires d'une médication, et la prise de drogues. L'âge, par contre, ne semble pas être lié à un risque de diminution du débit salivaire (50).

2.3.2.2 LE MICROBIOTE SALIVAIRE

Le microbiote présent dans la salive est constitué de bactéries « relarguées » par les surfaces environnementales de la bouche (les dents, le sulcus gingival, les joues, les palais durs et mous, les gencives, la langue, les amygdales...). Ce microbiote est unique et propre à chaque individu, relativement stable dans le temps, variable selon l'état de nutrition par exemple et donc influencé par le mode de vie. (51)

Le nombre d'espèces bactériennes de ce microbiote est estimé à plus de 700 (12). Dans l'étude de Takeshida (52), les auteurs ont identifié 550 espèces différentes, dont un ensemble de 72 espèces était commun à la majorité (75%) d'individus. Ce « noyau dur » de bactéries constitue 90% du microbiote salivaire de chaque individu (53). Ce microbiote oral contient des archaebactéries, des protozoaires tels que *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax*, mais on peut aussi retrouver jusqu'à 85 espèces de champignons, essentiellement des *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Cryptococcus*, qui avec *Streptococcus* forment un biofilm pathogène (54).

Des virus, généralement associés à des pathologies, peuvent être également présents et sont principalement des bactériophages (55).

Parmi ces virus, on trouve le virus des oreillons ou virus « ourlien », le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH-1 et plus récemment la souche de coronavirus SARS-CoV-2 qui provoque une maladie infectieuse de type zoonose virale, la COVID-19 (56).

L'analyse du microbiote salivaire pourrait permettre de diagnostiquer un état carieux en cas de présence de certaines espèces bactériennes spécifiques, identifiées dans la salive comme *Streptococcus mutans*, *Rothia*, de *Candida albicans* et des espèces de *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Leptotrichia* et *Capnocytophaga* (57).

De façon plus surprenante peut-être, la composition du microbiote salivaire est aussi caractéristique de plusieurs autres états physiologiques et pathologiques buccaux ou systémiques.

Parmi ceux-ci, nous pouvons citer :

- ✓ Des niveaux augmentés en *P. gingivalis*, *T. forsythia* et *F. nucleatum* rapportés chez les personnes obèses (58). Nous y reviendrons au cours de cette thèse.

- ✓ Une concentration salivaire élevée en glucose, corrélée à l'augmentation du nombre d'espèces de *Leptotrichia*, *Staphylococcus*, *Catonella* et *Bulleidia* (59).
- ✓ Une diversité du microbiote salivaire diminuée en cas de diabète de type 2 (60).
- ✓ Des carcinomes oraux (OSCC pour « oral squamous cell carcinoma ») montrant une abondance accrue de certaines espèces associées également aux parodontites, notamment avec *P. tanneriae*, *F. nucleatum* et *P. intermedia* (61). L'utilité des mesures de ces bactéries dans le diagnostic et le pronostic de l'OSCC est en cours d'investigation (62).
- ✓ L'abondance d'*Haemophilus*, diminuée dans l'arthrite rhumatoïde et pouvant être ramené à la normale pendant un traitement (63).

2.3.3 LES FONCTIONS DE LA SALIVE

2.3.3.1 PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES

Les composants de la salive agissent « de concert » pour protéger notre santé générale. On parle d'un concept de « **bouclier salivaire** », protecteur des dents et des muqueuses jusqu'à l'œsophage, où ce bouclier module des fonctions digestives, en neutralisant notamment l'acidité buccale. Ce concept de bouclier salivaire, protecteur de la santé orale dépend des quatre propriétés suivantes : un pouvoir tampon, un flux salivaire, un réservoir d'ions et des propriétés antibactériennes.

Le revêtement séromuqueux de la salive lui confère un rôle de barrière contre les traumatismes occasionnés par la mastication, la déglutition et la phonation ou les irritants comme les enzymes bactériennes protéolytiques et hydrolytiques produites essentiellement par la plaque dentaire (64), (65).

La lubrification salivaire est assurée en grande partie par ses mucines excrétées par les glandes salivaires mineures, aidant ainsi à la mastication, à la parole ou à la déglutition.

L'activité de ces mucines est due à leurs propriétés de forte adhésion et de viscosité (66).

Un rôle antibactérien est assuré par ces mucines en réalisant une sélection de l'adhésion des micro-organismes aux surfaces des tissus de la bouche contrôlant ainsi la colonisation des bactéries et des champignons (42).

La régulation du pH de la salive est maintenue par ce pouvoir tampon, assurée en partie par la présence de bicarbonates jouant un rôle de tampon principal en neutralisant les acides. Ce

pouvoir tampon est aussi maintenu à presque 90% par des peptides de bas poids moléculaires riches notamment en histidine (67). L'urée est considérée comme un autre régulateur du pH de la salive car elle libère de l'ammoniac et du CO₂ augmentant ainsi le pH salivaire. Ce pouvoir tampon permet le maintien de l'intégrité dentaire contre le processus de déminéralisation (68).

2.3.3.2 PROPRIETES ANTIBACTERIENNES

Les propriétés antibactériennes de la salive proviennent de nombreux agents immunologiques, certains dérivant des glandes salivaires. Par exemple, des enzymes, tels que les lysozymes, catalysent l'hydrolyse des peptidoglycanes qui font partie de la paroi des bactéries à Gram positif. De cette façon, les lysozymes, sécrétés par les granulocytes et les monocytes inhibent la croissance et agissent comme des antibiotiques naturels.

Ce rôle antibactérien est aussi dû à d'autres protéines : les mucines, les cystatines, les histatines et la lactoferrine. La Lactoferrine dans la salive a un rôle dans l'inhibition de *Porphyromonas gingivalis* et dans la destruction du biofilm que *Pg* constitue. (69). La lactoferrine joue également un rôle majeur dans la croissance bactérienne. En se liant au fer dans la salive, la lactoferrine le rend indisponible pour les bactéries et notamment pour les streptocoques cariogènes pour qui le fer représente une de leurs ressources nutritives essentielle. Ce concept de priver les bactéries de leurs nutriments vitaux est appelé « l'immunité nutritionnelle ». La lactoferrine, outre sa fonction de se lier au fer, bien décrite dans la littérature, joue un rôle de modulateur immunitaire avec une action forte contre les espèces de Streptocoques (70).

Le rôle antibactérien de la salive est modulé par la présence d'immunoglobulines (IgAs, IgG et IgM). Les IgAs et les mucines se lient fortement aux agents pathogènes des muqueuses (71).

2.3.4 CONCLUSION SUR LA SALIVE ET SON MICROBIOTE

La salive, par les nombreux rôles multifonctionnels de ses composants, représente toujours un sujet d'étude majeur en odontologie, et cela nous amène à nous poser quelques questions : que ce soit sur l'étude de l'intérêt des protéines salivaires pour la

reminéralisation dentaire ou encore sur le rôle des facteurs antibactériens présents dans la salive ou dans la formation de la plaque dentaire : a-t-on la possibilité de les cibler ?

Ces composants salivaires et le pouvoir tampon de la salive peuvent-ils être améliorés pour devenir plus sélectifs ? (39).

La salive peut donc se définir comme le fluide buccal le plus précieux, essentiel au maintien d'une bonne santé orale. Sa valeur continuera d'augmenter étant devenue, par ses multiples fonctions, par sa disponibilité et par la facilité de son prélèvement, une mesure non invasive de dépistage systémique pour le diagnostic et la recherche médicale. En effet elle « reflète » notre état de santé et l'analyse d'échantillon salivaire permet aussi l'évaluation du statut hormonal, neuronal, immunologique et métabolique. Il est par conséquent nécessaire que les praticiens de santé aient une base de connaissances approfondies sur la salive, son microbiote et ses fonctions. Une base de données sur le microbiote oral humain (HOMD) est accessible sur le web (www.homd.org), elle est organisée et basée sur la phylogénie, soit 2074 génomes représentant 529 taxons.

Le but de cette thèse sera de vous convaincre, en partageant nos idées et nos premiers résultats, du grand avenir de la salive et de ses biomarqueurs pour le diagnostic médical personnalisé : la médecine dentaire personnalisée.

3 LIEN ENTRE MICROBIOTE ORAL ET DIABETE

3.1 INTRODUCTION

Le microbiote oral et son équilibre jouent un rôle majeur dans l'homéostasie générale de l'individu. Toute rupture d'équilibre de ce microbiote entraîne une augmentation de certaines espèces bactériennes, notamment celles à Gram négatif, associée à la production massive de cytokines pro inflammatoires (72). Lors de ces pathologies orales, la parodontite ou les pathologies péri-apicales, on assiste à une translocation de ces bactéries, ou de leurs composants (métafacteurs), dans la circulation sanguine, qui entraîne ou qui maintient une inflammation chronique de bas grade (35). De nombreuses pathologies métaboliques ont aussi pour origine cette inflammation chronique : le diabète, l'obésité, la Nash (Stéatohépatite non alcoolique). **La figure 15** ci-dessous décrit les cheminements possibles de la dysbiose du microbiote oral et son impact. Ces processus créent une inflammation locale et systémique, due à la translocation bactérienne, et une inflammation chronique de bas grade en cause dans de nombreuses pathologies métaboliques.

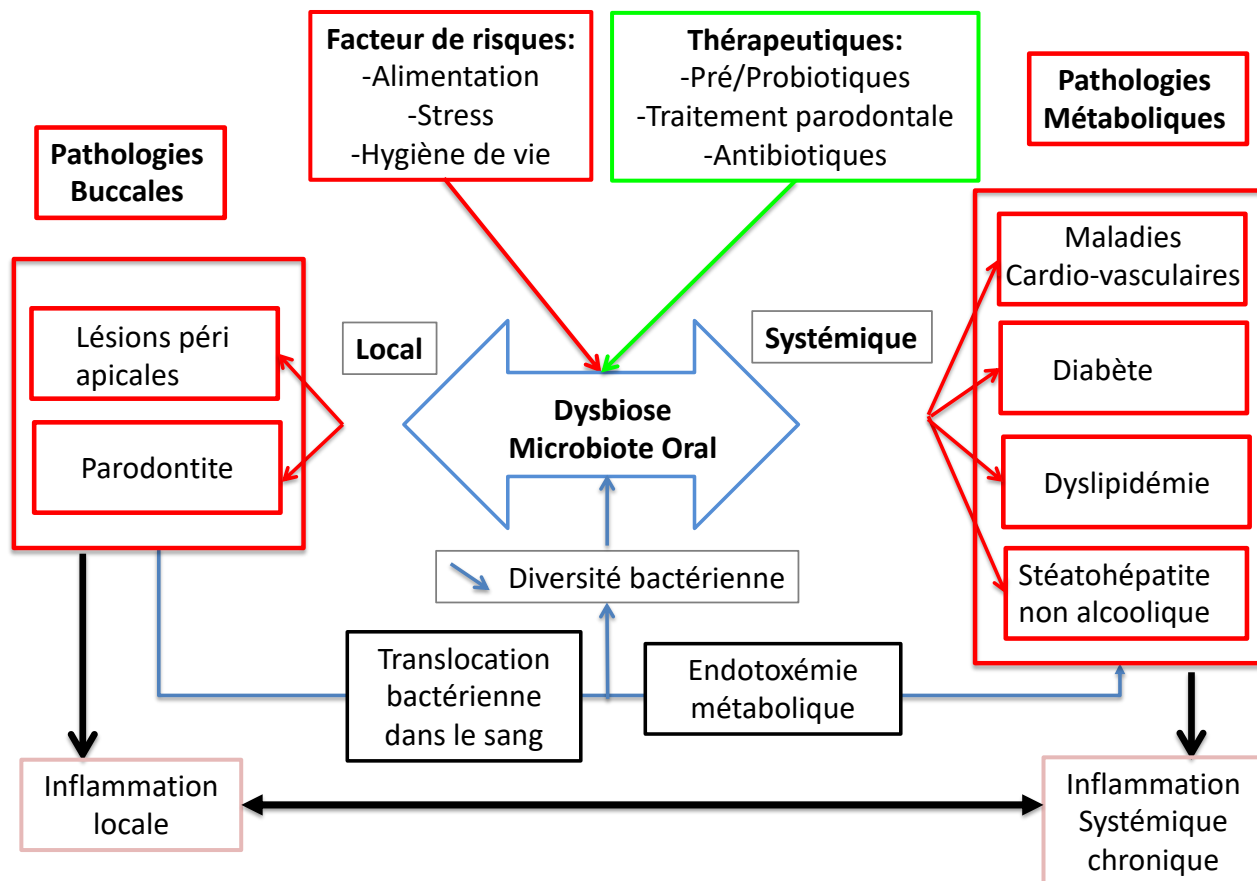


Figure 15 : Impact de la dysbiose du microbiote oral sur les troubles métaboliques et thérapeutiques

3.2 LE ROLE DU MICROBIOTE ORAL DANS LE DIABETE

3.2.1 LE DIABETE

3.2.1.1 DEFINITION

Le diabète est une affection chronique métabolique définie par une hyperglycémie à jeun égale ou supérieure à 1,26g/L, à deux reprises, ou égale ou supérieure à 2g/L à n'importe quel moment de la journée. Il est dû à un déficit de sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques qui est d'origine auto-immune pour le diabète de type 1 (DT1) et dû à une Insulino-Résistance (IR) décompensée pour le diabète de type 2 (DT2) (73). L'IR est une condition qui se manifeste également chez le sujet obèse ou dans le cadre d'un syndrome

métabolique diagnostiqué par la mise en évidence de dysfonctionnements physiopathologiques tels que l'hypertension, un taux élevé de sucre dans le sang, une augmentation du tour de taille, un faible taux de bon cholestérol et enfin un taux élevé de triglycérides. Cette hyperglycémie doit être mesurée à plusieurs reprises pour confirmer le diagnostic du diabète. ([How often do I need to test my blood glucose? \(https://www.diabetes.co.uk\)](https://www.diabetes.co.uk))).

3.2.1.2 ÉPIDEMIOLOGIE

En 2019, le nombre de sujet diabétiques dans le monde était de 463 millions, soit 6% de la population mondiale. Selon les prévisions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2045 ce chiffre atteindra 700 millions. 90% des diabétiques sont de type 2. Ce chiffre est important car 80% des diabètes de type 2 pourraient être évités grâce à une alimentation saine et des exercices physiques réguliers (74).

En Europe, 58 millions de personnes sont atteintes du diabète, dont 3,7 millions en France, un chiffre qui est certainement sous-estimé car environ un million d'individus seraient diabétiques sans le savoir. On peut estimer aujourd'hui que 33% des français présentent un risque élevé de développer un diabète (75). L'Organisation Mondiale de la Santé considère le diabète comme la première pandémie dans l'histoire de l'Humanité due à une pathologie non infectieuse et prévoit une augmentation dans le monde entier, voir **Figure 16**.

Carte Prévalence du diabète chez les adultes (20 à 79 ans) dans les Régions de la FID, classée par prévalence comparative du diabète ajustée en fonction de l'âge en 2019

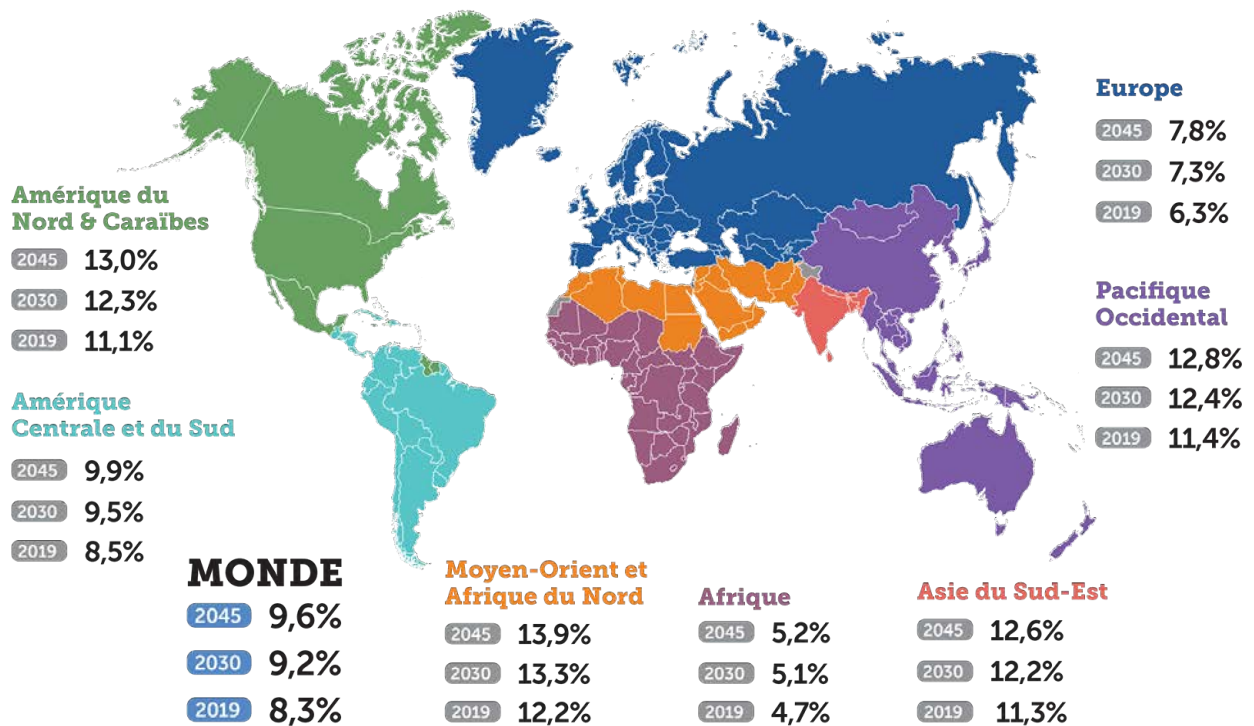


Figure 16 : Prévalence du diabète chez les adultes en 2019 par IDF Diabètes Atlas (<https://diabetesatlas.org/fr/sections/demographic-and-geographic-outline.html>)

3.2.1.3 PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABETE : INFLAMMATION – MICROBIOTE – REACTION IMMUNITAIRE

3.2.1.3.1 Les troubles de sécrétion de l'insuline

Les patients atteints de diabète présentent trois paramètres que l'on constate soit de façon isolée soit en combinaisons : Ce sont une intolérance au glucose, une insulino-résistance et à terme, une diminution de la sécrétion d'insuline (76).

C'est ainsi que les diabétiques perdent l'action de l'insuline sur les organes périphériques comme le foie, les muscles et le tissu adipeux.

Au cours de la maladie DT2, (Diabète de Type 2) on assiste à une détérioration progressive de la signalisation de l'insuline, appelé « insulino-résistance » (IR), qui est définie par l'altération de la sensibilité à l'insuline de l'organisme (76). Cette IR témoigne d'une atteinte des cellules β du pancréas chez la plupart des diabétiques. Au début, il y a une augmentation compensatoire de la masse des cellules β . A terme, il y aura un épuisement des cellules β du

pancréas, responsable de la survenue de l'hyperglycémie. Ainsi, le patient entre dans un cercle vicieux où l'hyperglycémie contribue aussi à entraîner l'apoptose des cellules β (77).

3.2.1.3.2 Mécanismes moléculaires de l'altération de l'insuline.

Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de l'altération de la sécrétion d'insuline ?

Les mutations dans le gène de l'insuline sont rares, mais dans environ 10% des patients diabétiques il y a des mutations du gène porté sur le chromosome 7 codant pour la glucokinase (78). On peut évoquer deux concepts pouvant expliquer les effets néfastes de l'hyperglycémie : La glucotoxicité (79) et la lipotoxicité (80).

L'hyperglycémie interfère avec le débit hépatique et diminue la quantité de glucose qui entre dans les tissus périphériques. En retour, il y a une oxydation accrue des acides gras, qui entraîne une augmentation d'acétyl-CoA. Ce dernier stimule la néoglucogénèse et diminue la glycolyse.

Ainsi les acides gras contrebalancent l'activité de l'insuline et contribuent aux défauts de la sécrétion d'insuline (79). Tout ceci participe au « cercle vicieux » du diabète évoqué précédemment.

3.2.1.3.3 Conséquences de l'insulino-résistance

Dans l'insulino-résistance, il y a trois niveaux de dysfonctionnement dans les récepteurs à l'insuline : L'hyperinsulinémie prolongée exerce un rétrocontrôle négatif sur le nombre et la densité des récepteurs à la surface des cellules, via un processus d'endocytose (81). Des mutations du récepteur chez les patients diabétiques altèrent la fixation de l'insuline et l'ancrage du récepteur à la surface des cellules (82). La fixation du ligand sur le récepteur s'effectue correctement, mais il y a une altération dans la cascade des kinases en aval (83).

Comme nous l'avons évoqué, l'insulino-résistance touche essentiellement trois organes du métabolisme qui sont le foie, le tissu adipeux et le muscle. Dans le foie, on assiste à une augmentation de la production de glucose d'environ 20% par rapport à un sujet sain. En même temps, on voit une augmentation de la néoglucogénèse basale lors du jeûne. Il existe également une altération du métabolisme des acides gras résultant de leur concentration élevée dans le sang qui contribue à stimuler la néo-glucogénèse dans le foie (84). Dans le tissu adipeux, on constate une lipolyse accrue chez le patient diabétique à jeun. Cette

augmentation est due à la libération des acides gras dans le sang qui favorise l'hyperglycémie via le métabolisme glucidique du foie. Nous sommes de nouveau en présence d'un cercle vicieux qui sous-tend les observations que l'obésité est un facteur de risque du diabète et qu'un grand pourcentage de diabétiques sont obèses.

Le tissu périphérique le plus atteint par l'insulino-résistance est le muscle squelettique. De nombreuses cibles moléculaires ont été identifiées dans ce tissu. Des tyrosines phosphatases participant à la déphosphorylation de la sous-unité β du récepteur à l'insuline et aussi d'autres effecteurs de la cascade cytosolique notamment les Substrats des Récepteurs de l'Insuline (IRS) IRS-1 et 2 (85) ou encore des modulateurs intracellulaires clés dans l'activité des récepteurs à l'insuline. L'hyper-insulinémie est responsable d'une délocalisation des IRS du récepteur qui passe dans le cytoplasme de la cellule musculaire, sous forme libre. Également, il y a une diminution de la synthèse du glycogène qui est liée à un défaut de captation du glucose sanguin vers la cellule musculaire. Cette captation requiert un transporteur, GLUT4, dont la translocation à la surface de la cellule est altérée dans le diabète (86).

3.2.1.3.4 Un nouveau paradigme de l'Insulino-Résistance

On assiste depuis quelques années à un nouveau paradigme de l'insulino-résistance, impliquant l'inflammation, l'immunité et le microbiote. Dans ce paradigme, les changements de microbiote seraient à l'origine des phénomènes d'obésité et d'insulo-résistance (76). Ce nouveau concept pour le diabète de type 2 propose que le « moteur » de cette pathologie pourrait être une inflammation chronique de bas grade (87), qui serait elle-même le résultat d'une dysbiose de ce microbiote oral. En effet, les diabétiques présentent dans le sang et dans le tissu adipeux une augmentation des niveaux de certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6 (88). Corrélation n'indique pas forcément cause ! Cependant certaines études ont permis de disséquer les mécanismes moléculaires liant l'inflammation au diabète. Par exemple, le traitement par anti-TNF- α améliore significativement la capture du glucose dans le tissu adipeux et la glycémie sanguine des souris en réponse à l'insuline (88).

Comment ces cytokines pro-inflammatoires peuvent-elles altérer la sensibilité à l'insuline ?

Tout comme des acides gras, ces cytokines vont activer les kinases JNK (c-Jun N-terminal Kinases). Ces kinases vont phosphoryler les effecteurs, IRS-1 et 2, impliqués dans la

transmission du signal de l'insuline. Une fois que les IRS-1 et 2 sont phosphorylés sur des sérines, ils ne peuvent plus se fixer au récepteur à l'insuline, ce qui empêche la transduction du signal de ce récepteur.

D'autres voies de transduction sont également affectées : on peut citer JNK qui régule le facteur de transcription AP-1 responsable d'une inhibition du signal à l'insuline et IKK (IkB kinase) inhibant l'action de l'insuline en activant le facteur de transcription NF- κ B (**Figure 17**) (87).

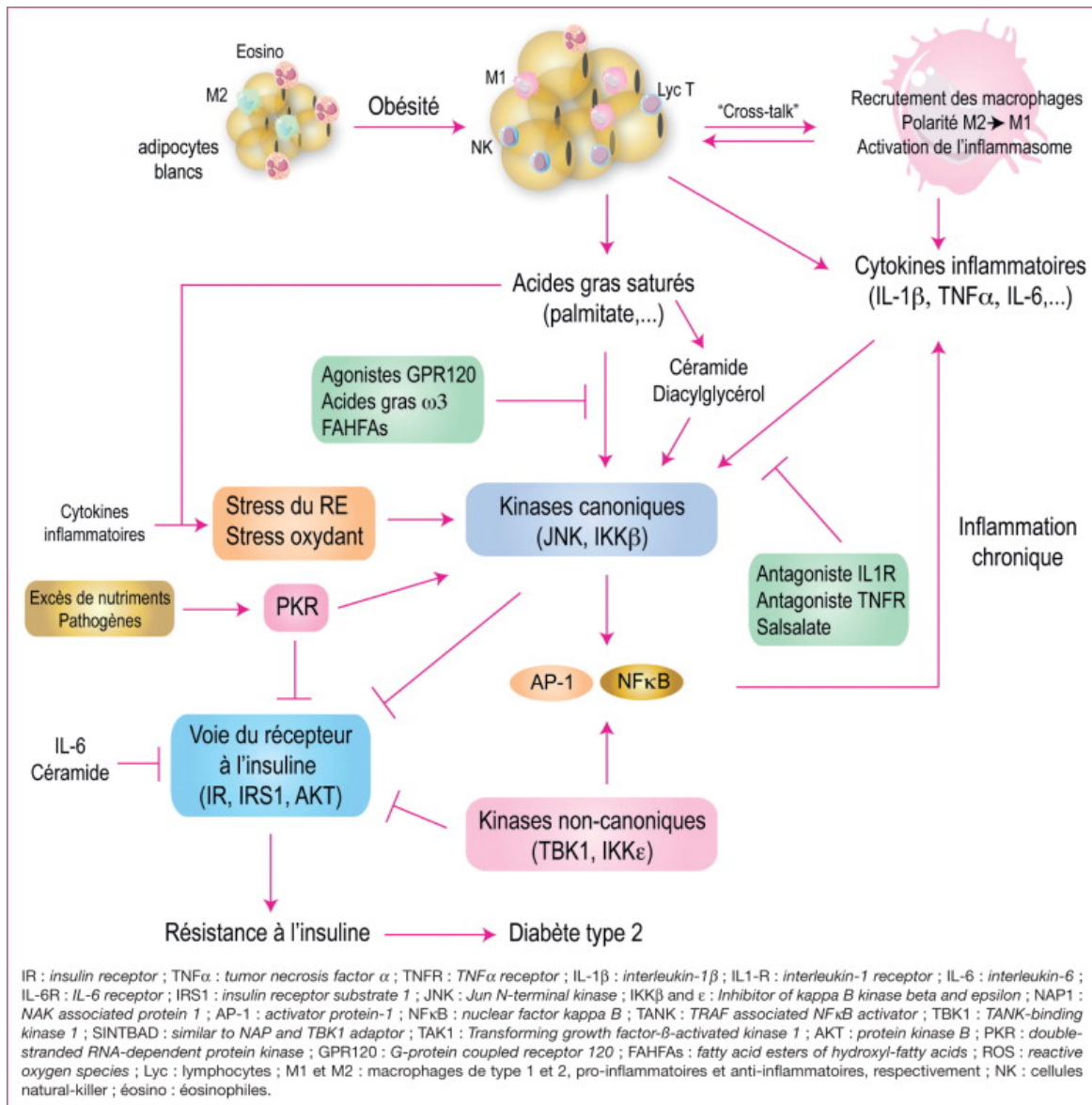


Figure 17 : Description des différentes voies de signalisation de l'insulino-résistance (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1957255715300754>)

3.2.1.3.5 Autres cellules impliquées dans l'insulino-résistance

1. Les macrophages

Le tissu adipeux de patients obèses montre une infiltration majeure de macrophages (89). Ces macrophages présentent des caractéristiques pro-inflammatoires (90) et ils ont été nommés macrophages M1 (91) car ils sont activés par une voie classique, par les cytokines inflammatoires et /ou par des produits microbiens. Les macrophages activés par des voies alternatives, tels l'IL4 / IL13, les complexes immuns, l'IL10 ou les glucocorticoïdes sont appelés macrophages M2.

Les macrophages M1 et M2 diffèrent en termes de récepteurs membranaires, de synthèse de cytokines et d'activité fonctionnelle : alors que les macrophages M1 sont inflammatoires et microbicides, les macrophages M2 modulent la réponse immunitaire et sont faiblement microbicides. (92)

On constate un switch de polarisation des macrophages d'un profil anti- inflammatoire M2 vers un profil pro-inflammatoire M1 dans les désordres métaboliques (93). Cette activation M1 peut être induite par des antigènes comme les LPS, par des bactéries à Gram négatif ou par l'interféron- γ (94). Les macrophages M1 montrent une augmentation de la sécrétion de TNF- α , IL-6 et IL-12 et activent l'enzyme iNOs responsable de la production de réactifs oxygénés.

2. Les lymphocytes

Le tissu adipeux de sujets obèses montre un changement de profil des lymphocytes T vers un profil Th1 qui participe au recrutement des macrophages et leur polarisation en type M1 (95). Un traitement par anticorps dirigés contre les lymphocytes T diminue l'infiltration macrophagique chez la souris nourrie avec un régime gras (89). Il est possible que ce changement représente le stade premier du développement de l'insulino-résistance (89). Ces lymphocytes T CD4+ et CD8+ présents dans le tissu adipeux hypertrophié sont à l'origine d'une sécrétion d'IFN γ et de molécules pro-inflammatoires connues pour altérer les voies métaboliques (96). Winer et coll. ont proposé également l'implication des lymphocytes B dans le tissu adipeux de souris mangeant gras (97).

3. Le microbiote

Le rôle du microbiote intestinal dans l'IR est maintenant bien décrit et documenté. Nous nous attacherons ici à l'étude du microbiote oral qui est moins documenté dans la littérature actuelle. La composition des microbiotes diffère entre patient diabétique et patient sain (98). Le microbiote intestinal est différent entre les individus obèses et normaux (99). On définit la corpulence d'un individu par son IMC (Indice de Masse Corporelle) ainsi un individu sera dit normal si son IMC est compris $18,5 < \text{IMC} < 25$, pour un obèse $\text{IMC} > 30$. Nous reviendrons sur ces paramètres plus tard. De plus, les patients obèses présentent des ratios différents entre les espèces *Bacteroidetes* et *Firmicutes* par rapport à des sujets maigres c'est-à-dire avec un IMC inférieur 18,5. Les patients obèses sont également caractérisés par une réduction de la diversité bactérienne et une altération de la représentation des gènes bactériens (100). L'implication du microbiote intestinal a été démontrée par le développement de l'obésité chez des souris élevées sans germes pathogènes puis colonisées par la flore microbienne issue de souris obèses (101). En présence d'une alimentation riche en graisse, il y a des changements dans le microbiote intestinal et des modifications de l'expression des molécules antigéniques bactériennes (98).

Les travaux de notre laboratoire ont démontré que la concentration en LPS est augmentée dans le sang chez l'homme et dans les modèles animaux de diabète et d'obésité (76). Ce phénomène, l'«endotoxémie métabolique», est notamment corrélée à la proportion de graisses saturées dans l'alimentation et aux variations du ratio *Bacteroidetes* / *Firmicutes* du microbiote intestinal (102). Un régime riche en graisse modifie la flore intestinale en favorisant les bactéries riches en LPS, bactéries à Gram négatif (103).

Ainsi, l'inflammation métabolique trouve son origine dans les microbiotes bactériens qui perturbent la réponse inflammatoire innée et acquise. Nous examinerons le rapport entre l'inflammation et le microbiote dans la troisième partie de cette thèse.

3.2.2 LE LIEN DIABETE-MICROBIOTE ORAL

De nombreux modèles expérimentaux montrent le lien étroit entre les maladies liées à l'obésité telles que les maladies hépatiques non alcooliques (NASH), et les modifications du

microbiote. Dans ces modèles, des modifications alimentaires entraînent des augmentations de croissance bactérienne qui ensuite engendrent des désordres locaux et / ou systémiques.

3.2.2.1 PHYSIOLOGIE DE L'INFLAMMATION CHRONIQUE DE « BAS GRADE » : QUELS MECANISMES ENGENDRENT DES DESORDRES LOCAUX ET SYSTEMIQUES ?

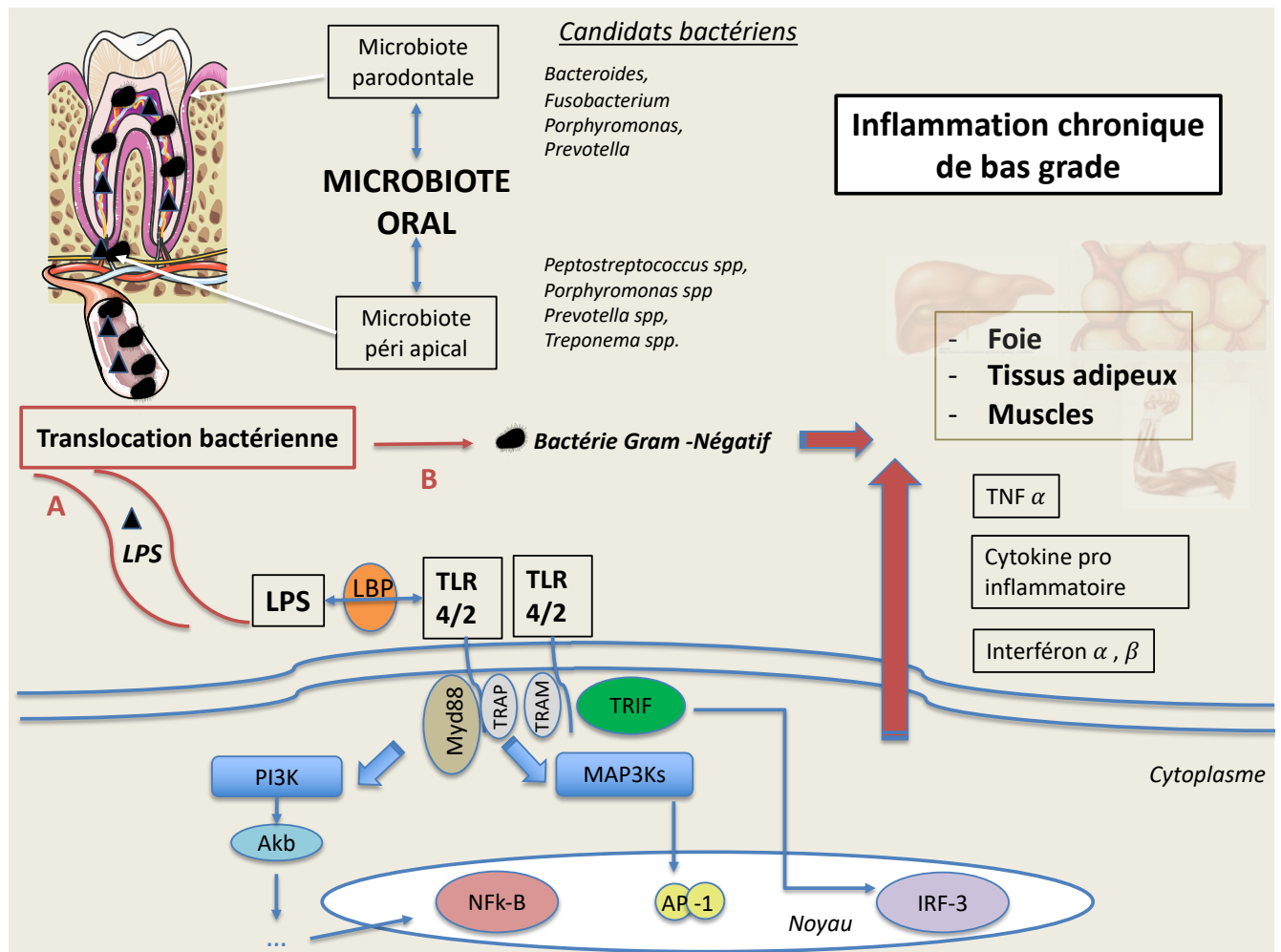


Figure 18 : Schéma d'une inflammation chronique de bas grade

Le schéma ci-dessus (Figure 18) représente les deux voies directe et indirecte (par translocation bactérienne dans le sang) responsable d'une augmentation de cytokines pro-inflammatoires au niveau des trois tissus cible de l'insulino résistance avec pour origine une dysbiose de ce microbiote oral.

La réponse inflammatoire est étroitement corrélée à la réponse immunitaire. C'est une réponse aux attaques physiques, bactériennes, virales et chimiques que subit l'organisme. Cette réaction inflammatoire, quand elle est régulée, contrôlée et surtout limitée dans le temps, a un effet protecteur qui est nécessaire à une bonne santé générale. On l'appelle alors une «inflammation aiguë». A contrario, un déséquilibre des facteurs pro- et anti-inflammatoires entraîne une réponse disproportionnée et agressive, que nous appelons «l'inflammation chronique». L'activation des cellules immunitaires en réponse à une agression déclenche les mécanismes cellulaires qui produisent différents médiateurs de l'inflammation (104).

L'inflammation chronique dite «de bas grade» est une forme insidieuse qui se développe silencieusement, pendant une longue période, et qui constitue un facteur de risque majeur dans l'aggravation ou dans l'apparition de pathologies métaboliques par exemple le diabète, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les maladies cardiovasculaires ou les maladies neurodégénératives (105).

3.2.2.2 QUELS SONT LES MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE CETTE INFLAMMATION CHRONIQUE ?

Cette dysbiose du microbiote oral permet le changement des acteurs antigéniques et la modification des DAMPs et des PAMPs (106) (107). Tout d'abord, la présence de motifs moléculaires associés aux pathogènes (DAMPs) ou des PAMPs, est reconnue par les cellules immunitaires sentinelles présentes dans les tissus environnants (des mastocytes, des macrophages et des cellules dendritiques) à travers leurs récepteurs de type «Pattern Recognition Receptor» (PRR) membranaires, en particulier les récepteurs TLR (Toll Like Recepteurs). Ceci entraîne le recrutement de cellules circulantes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes, cellules NK et lymphocytes T et B) et l'élimination de l'agresseur. (108).

3.2.2.2.1 Le principe de la réaction inflammatoire

Le principe de la réaction inflammatoire repose sur l'activation de réactions de phosphorylation (appelées les « cascades des kinases ») induisant la production de nombreux facteurs de transcription nucléaires comme NF- κ B et AP1. Ces facteurs contrôlent ensuite l'expression de médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF α et cytokines pro

inflammatoires. L'activation des protéines des inflammasomes induisent la synthèse d'interleukines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6).

La production de prostaglandines et de leucotriènes pro-inflammatoires provient de l'activation du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique, tandis que la NADPH oxydase et NO synthase sont activées, elles génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (109).

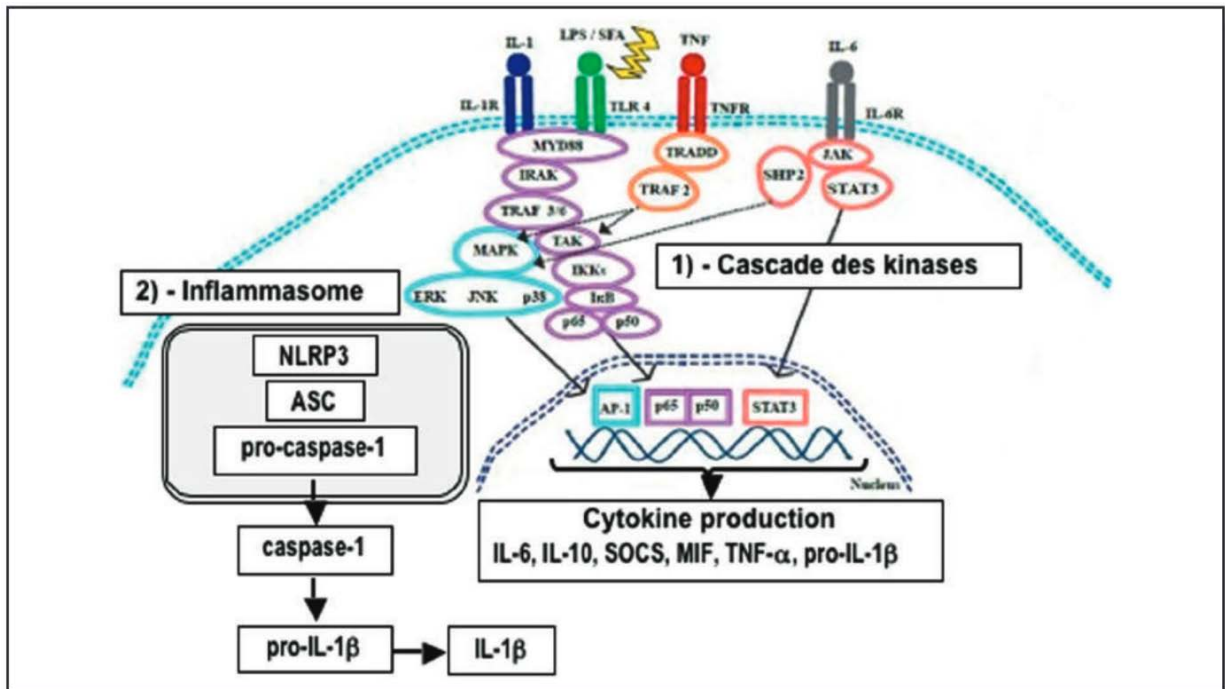


Figure 19: Parcours d'un signal inflammatoire extracellulaire vers le noyau ([https://iepp-eu.com/wp-content/uploads/2013/04/23 Lettre IEPP inflammation-chronique.pdf](https://iepp-eu.com/wp-content/uploads/2013/04/23_Lettre_IEPP_inflammation-chronique.pdf))

La transduction d'un signal inflammatoire vers le noyau de la cellule nécessite une succession de réactions de phosphorylation en chaîne, catalysées par les protéines kinases. L'activation de l'inflammasome se réalise selon plusieurs voies, celles des MAP Kinases, des IKKs et celles des JAK/STAT (Janus Kinase et Signal Transducteurs et Activateurs de la transcription) (Figure 19).

3.2.2.3 LES PRINCIPAUX MEDIATEURS DE L'INFLAMMATION

Parmi les principaux médiateurs de l'inflammation on notera ici :

- ✓ Le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) qui après activation de NF- κ B est produit par les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes.
- ✓ L'IL1 (Interleukine 1) qui est sécrétée par les leucocytes, fibroblastes, cellules endothéliales après la reconnaissance du signal par les PAMPs. La transformation de la pro-IL1 β -inactive en IL1 β est réalisée par la caspase 1 ou ICE (Interleukin 1 β Converting Enzyme), présente dans l'inflammasome (105).
- ✓ Les principaux producteurs de médiateurs lipidiques de l'inflammation sont la phospholipase A2 (PLA2) qui catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires et permet en particulier la libération de l'acide arachidonique. Ce dernier est ensuite oxydé par les cyclo-oxygénases (COX 1 et 2) et lipo-oxygénases (LOX) en leucotriènes (LT) et prostaglandines (PG) (Figure 20) (110).
- ✓ Ces composés ont une activité chimiotactique pour les neutrophiles et les macrophages. Ils aident à l'arrivée des leucocytes sur le site de l'inflammation.

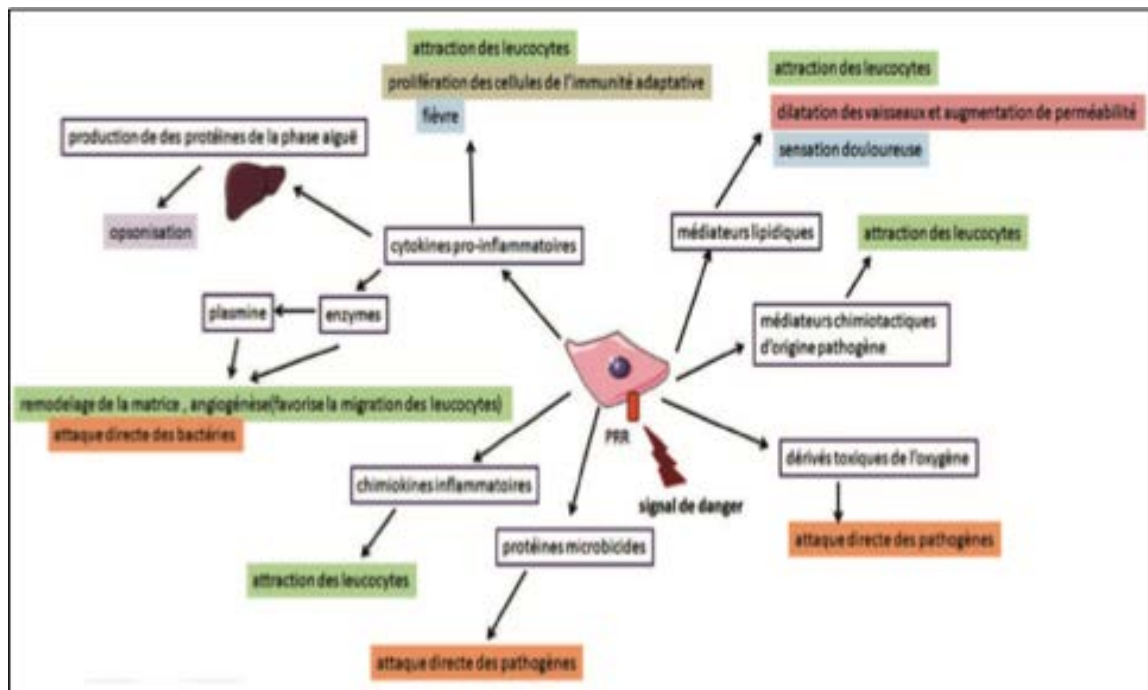


Figure 20 : Médiateurs cellulaires de l'inflammation

(<http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/immunité-innée-barrières-naturelles-et-réaction-inflammatoire/les-médiateurs-de-l2019inflammation>)

Parmi ces médiateurs de l'inflammation, on remarque les formes actives de l'oxygène. Par exemple, la transduction du signal inflammatoire stimule l'activité cellulaire de la NADPH oxydase. La NADPH oxydase est l'enzyme qui catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde (O_2^-), précurseur des deux principales familles d'oxydants : les formes réactives de l'oxygène et les formes réactives de l'azote.

Comme nous l'avons suggéré précédemment, une perturbation dans l'équilibre entre molécules pro- et anti-inflammatoires conduit à la chronicité de la réaction inflammatoire. Nous avons vu que le diabète pourrait être engendré par des changements du microbiote intestinal. Que connaît-on d'un lien éventuel entre le microbiote oral et le diabète ? D'un côté plusieurs auteurs ont souligné des changements du microbiote oral chez les sujets diabétiques (111) (112) (113), bien qu'il faille être prudent parce que certains de ces changements peuvent être le résultat de traitements subis par ces patients, plutôt qu'un reflet de leur maladie (114).

D'un autre côté, le microbiote oral peut influencer la progression du diabète (115) et certains traitements d'hygiène oral, tels les bains de bouche, peuvent même avoir un effet néfaste sur l'évolution du diabète. En effet ce type de rince bouche contient des agents antibactériens pouvant avoir un impact critique sur les bactéries du microbiote oral pour la formation d'oxyde nitrique, prédisposant le patient à des troubles métaboliques comme le diabète, mais aussi à un risque accru d'hypertension (116).

Entre le microbiote oral et le diabète, de nombreux mécanismes sur cette interaction bidimensionnelle restent à élucider. Nous allons donc étudier dans la troisième partie de cette thèse les mécanismes moléculaires en cause : lien microbiote oral et diabète de type 2.

4 RESULTATS EXPERIMENTAUX

AVANT PROPOS

L'objectif de nos travaux a été de montrer le lien entre une dysbiose du microbiote oral associée aux maladies buccales et les maladies métaboliques. En tant que clinicien, j'ai pu constituer des cohortes humaines pour valider nos hypothèses. A la suite de ces études cliniques, nous avons montré la causalité d'une bactérie buccale, *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) sur l'insulino résistance, à travers l'étude sur le petit animal.

La première partie de nos travaux est consacrée à une étude observationnelle sur la santé bucco-dentaire des sportifs de haut niveau caractérisés par un microbiote oral dysbiotique pouvant entraîner des conséquences néfastes sur leur recherche de performance. Nous avons analysé les paramètres buccaux et le microbiote oral chez les sportifs de haut niveau et nous les comparerons à un groupe témoins apparié.

Dans la deuxième partie, nous étudierons par quels mécanismes moléculaires le microbiote oral contribue à la régulation glycémique au cours du jeun et après une prise alimentaire. Nous avons analysé les indices cliniques buccaux, la salive et le microbiote dans un groupe d'hommes et de femmes. Nos résultats montrent une signature du microbiote oral en fonction du statut nutritionnel et du genre (Homme – Femme) et notamment pour le microbiote salivaire dont l'identification de candidats bactériens pourrait être utilisée à des fins de diagnostic et de prévention.

Enfin nous rapporterons dans une troisième partie, un travail de science fondamentale, centré sur les mécanismes moléculaires d'un candidat bactérien spécifique, *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), dans l'insulino résistance au cours du diabète de type 2. Nous avons mis en évidence le métafacteur LPS de *Pg* et la voie immunitaire des lymphocytes TH17 comme acteurs de l'aggravation de l'insulino résistance induite par *Porphyromonas gingivalis*.

4.1 RESULTATS EXPERIMENTAUX (I)

SANTE BUCCO-DENTAIRE ET STATUT MICROBIOLOGIQUE CHEZ LES JOUEURS DE RUGBY PROFESSIONNELS : UNE ETUDE CAS-TEMOINS

Oral health and microbiota status in Professional Rugby players: A case-control study

Matthieu Minty, Thibault Canceill, Sylvie Lê, Pauline Dubois, Oihana Amestoy, Pascale Loubieres, Jeffrey E Christensen, Camille Champion, Vincent Azalbert, Estelle Grasset, Sara Hardy, Jean-Michel Loubes, Jean-Philippe Mallet, François Tercé, Jean-Noël Vergnes, Rémy Burcelin, Matteo Serino, Franck Diemer, Vincent Blasco-Baque.

J Dent. 2018 Dec. ;79 :53-60. doi: 10.1016/j.jdent.2018.10.001. Epub 2018 Oct 5.

4.1.1 INTRODUCTION

Après l'acquisition du Diplôme Universitaire (DU) de Médecine Bucco- Dentaire du Sport en 2018, nous avons eu l'opportunité de recruter des joueurs de Rugby pour étudier une cohorte de sportifs professionnels dans le but de décrire leur santé buccale.

En effet, l'état de santé bucco-dentaire des athlètes de haut niveau est une préoccupation croissante qui pourrait affecter négativement leurs performances sportives et leur qualité de vie (117) (118). Une mauvaise santé bucco-dentaire chez les athlètes a notamment été signalée lors des Jeux Olympiques de Londres de 2012 (117). Certaines maladies, comme les caries dentaires ou les maladies parodontales, sont plus fréquemment observées chez les athlètes mais la relation causale correspondante reste encore inconnue. Parmi les activités physiques professionnelles exigeant une pratique intense, il y a le rugby, dont la popularité a notamment augmenté depuis l'introduction du professionnalisme en 1995. Selon World Rugby, le nombre mondial de joueurs inscrits est d'environ 3,2 millions d'individus (119) (120) et une revue systématique récente a souligné la mauvaise santé bucco-dentaire des athlètes d'élite (120). Par conséquent, il est urgent d'identifier les facteurs causaux qui pourraient nuire au bien-être des athlètes et à leurs performances.

Les joueurs de Rugby souffrent principalement de traumatismes dentaires (121) (122) (123) et de l'utilisation de protège-dents (124) (125). En dehors de ces expériences traumatisantes, on sait peu de choses sur les mécanismes physiopathologiques par lesquels une pratique intense du Rugby altère la santé bucco-dentaire.

- Une première hypothèse serait liée à l'altération du tonus immunitaire. Il a été précédemment rapporté que la pratique d'un sport de haut niveau a un impact sur les systèmes immunitaire et cardiovasculaire (126). L'exercice physique intense augmente les niveaux de cytokines pro-inflammatoires et inhibe l'activité des cellules immunitaires innées (127). Par conséquent, les athlètes sont affectés par une immunosuppression temporaire appelée «open window» qui pourrait altérer l'homéostasie de la cavité orale (128).

- Une seconde hypothèse serait liée à l'impact du sport intensif sur la perturbation de l'équilibre du microbiote oral. La cavité buccale est en effet l'une des niches les plus diverses pour le microbiote buccal, composée de plus de 10^{10} bactéries comprenant plus de 450 espèces à l'âge adulte (85) (129). Ainsi, causalement liée à un système immunitaire affaibli, une dysbiose buccale induite par le sport intensif pourrait entraîner des maladies bucco-

dentaires comme les caries dentaires (52) et des infections chroniques associées à un biofilm pathologique (130). Par ailleurs, une diminution du flux salivaire et une augmentation du pH salivaire sont également constatées chez les athlètes (127). Ceci, combiné à l'immunité perturbée, pourrait induire une dysbiose, à savoir une rupture de l'équilibre du microbiote buccal (131) conduisant à des maladies dentaires chroniques.

Nous avons donc décidé de mener une étude dont le but était d'évaluer la santé bucco-dentaire et la composition du microbiote buccal des joueurs de Rugby d'élite par rapport à la population générale. Les objectifs secondaires étaient d'évaluer le statut parodontal des Rugbymen d'élite et d'analyser la composition microbiologique et le pH de leur salive, par un examen oral et un prélèvement salivaire.

4.1.2 METHODES

Nous avons suivi les directives de la déclaration STROBE pour la réalisation de notre étude observationnelle (132) ; cette étude décrite ici a été approuvée par la *Commission Éthique du Département de Médecine Générale de Midi Pyrénées*.

Pour répondre aux objectifs précédemment décrits, nous avons réalisé une étude observationnelle cas témoins. Seuls les hommes ont été inclus dans notre étude car il n'y a pas de joueuses professionnelles de Rugby en France.

Les critères d'inclusion pour les cas étaient :

- 1) Être un joueur de Rugby professionnel inscrit à l'Union Sportive Colomiers Rugby, sud-ouest de la France.
- 2) Un accord pour un examen oral et des analyses biologiques de la salive et de la plaque dentaire.
- 3) Une parfaite compréhension du formulaire de consentement et un accord de participation signé.

Nous avons qualifié ce groupe de « Groupe de Joueurs de Rugby Professionnels » (PRG). Les sujets témoins n'étaient pas des joueurs de Rugby professionnels mais provenaient de la même zone géographique.

Les critères d'inclusion pour les témoins étaient les mêmes que les critères N° 2 et N° 3, et nous avons ajouté l'absence de toute maladie systémique qui pourrait avoir un effet négatif

sur la santé bucco-dentaire (par exemple, maladie métabolique incontrôlée sévère, insuffisance cardio-pulmonaire, infection, radiothérapie ou chimiothérapie pour le traitement du cancer). En effet, de telles conditions pourraient constituer des facteurs de confusion dans nos analyses, car les Rugbymen professionnels sont normalement en bonne santé générale.

4.1.2.1 COLLECTE DES DONNEES

Les données ont été collectées sur quatre mois, de juillet à octobre 2016, lors des périodes d'entraînement des joueurs de Rugby. Les cas ont été examinés dans les locaux de l'Union Sportive Colomiers Rugby et les sujets témoins dans les mêmes conditions procédurales. Les contrôles ont été recrutés dans une population d'âge et de niveaux sociaux professionnel comparables, en utilisant une stratégie d'appariement : pour chaque cas, un contrôle aléatoire correspondant a été inclus selon l'âge et le niveau d'éducation.

4.1.2.2 CARACTERISTIQUES MEDICALES ET SOCIODEMOGRAPHIQUES

Des efforts pour réduire les biais potentiels ont été faits en collectant des informations sur :

1. La prise de compléments alimentaires et diététiques à l'aide de questionnaires standardisés (132). Pour évaluer si les différences de microbiote buccal et de maladies bucco-dentaires pourraient être liées aux habitudes alimentaires, nous avons évalué la quantité et la fréquence de la prise alimentaire et le type d'aliments (133) (**Tableau 2**).
2. La qualité de vie en général, la qualité buccale, avec leurs paramètres sociodémographiques (rapports sociaux, générationnels ou de la santé), leurs usages de médicaments et leurs habitudes de vie...
3. L'utilisation des services médicaux et dentaires (questions sur la dernière visite chez le dentiste et le niveau de stress noté sur une échelle de 10 points) (**Tableau 1**).
4. Les comportements liés à l'hygiène bucco-dentaire (134).

4.1.2.3 CARACTERISTIQUES DE SANTE BUCCO-DENTAIRE

Les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont été utilisés pour diagnostiquer le statut carieux (indice CAO) de chaque participant (135), conformément aux directives de

l'OMS concernant l'examen clinique en épidémiologie (136) ainsi que l'indice « Significant Caries » (SiC) de chaque groupe. L'état parodontal a été évalué à l'aide de l'indice de Loe and Sillness (LSI), de l'Indice de Plaque (IP) et du saignement au sondage (BOP) (137). Quatre dentistes diplômés ont effectué les examens de santé bucco-dentaire. Avant l'inclusion, les quatre examinateurs ont été formés à un processus d'étalonnage axé à la fois sur les caries et l'état parodontal.

4.1.2.4 ANALYSE DU MICROBIOTE ORAL

La salive a été prélevée après avoir mâché un bloc de paraffine stérile pendant 1 minute. Ensuite, cette salive a été congelée et stockée à -80°C, avec du glycérol, pour l'analyse taxonomique du microbiote oral. Concernant la culture et l'identification des pathogènes buccaux, la composition du microbiote oral a été déterminé comme décrit précédemment (138). Les bactéries ont été cultivées sur des plaques de gélose moyenne non sélectives ou sélectives (138). Le comptage des bactéries aérobies a été effectué selon les critères du Bergey's Manual (139) (140).

Les régions de l'ADN bactérien 16S V2 à V4 ont été ciblées par les amorces 357wf-785R et la technique MiSeq a été appliquée pour générer une moyenne de 10 000 séquences par échantillon par RTLGenomics (<http://rtlgenomics.com/>).

Pour une description complète des filtres bio-informatiques appliqués, voir le lien : (http://www.rtlgenomics.com/docs/Data_Analysis_Methodology.pdf) .

4.1.2.5 GESTION ET ANALYSE DES DONNEES

Les données ont été masquées pour maintenir la confidentialité des participants. Des tests de Mann-Whitney non appariés ont été réalisés à l'aide de GraphPad Prism version 5.00 pour Windows Vista (GraphPad Software, 2365 Northside Dr. Suite 560 San Diego, CA 92108). Le niveau de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$. La matrice de sortie taxonomique dérivée du séquençage de l'ADNr 16S contenant les données de comptage pour les «Unités Taxonomiques Opérationnelles» (OTU) par échantillon a été traitée avec l'interface en ligne Galaxy pour l'algorithme LEfSe (141) (Taille de l'effet de l'analyse discriminante linéaire) en utilisant un seuil de signification du paramètre alpha pour le test de Kruskal-Wallis (KW) parmi les classes, réglé à 0,05 et le seuil de score LDA logarithmique a

été établi à 2,0 pour la génération de cladogramme. Pour évaluer si les changements du microbiote oral étaient liés au développement des caries, le métagénome fonctionnel a été déduit des données du tableau de comptage des séquences 16S en cluster à l'aide de la version Web de Piphillalgorithm (<http://secondgenome.com/Piphillin>) (142). Piphillin utilise la correspondance directe du plus proche voisin entre les amplicons d'ARNr 16S et les génomes pour prédire les génomes représentés.

Grâce à ce processus d'inférence, les valeurs d'abondance de chaque OTU ont été normalisées à leurs nombres de copies d'ARNr 16S prédits respectifs, puis multipliées par les nombres de gènes respectifs pour la prédiction du métagénome.

Le résultat principal qui en a résulté était une liste d'orthologues de l'Encyclopédie de Kyoto des Gènes et des Génomes (KEGG) (143) et des données de comptage de gènes prédites pour chaque échantillon. Nous avons utilisé des scripts internes pour analyser la sortie en catégories de modules KEGG pour la hiérarchie des chemins fonctionnels en utilisant la base de données KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/module.html>) .

La matrice de sortie contenant l'abondance relative des groupes orthologues KEGG (KO) par échantillon a été traitée avec l'interface en ligne Galaxy pour LEfSe en utilisant un seuil de signification du paramètre alpha pour le test de Kruskal-Wallis (KW) parmi les classes fixées à 0,05 et le score LDA logarithmique (seuil fixé à 2,0).

Ensuite, nous avons effectué une Analyse en Composantes Principales (ACP) pour identifier les paramètres qui caractérisent le mieux le Groupe de joueurs de Rugby Professionnels (PRG) (**Figure 24**). Parmi ces variables figurent les groupes bactériens du microbiote oral identifiés par le cladogramme et les paramètres cliniques tels que l'âge, le poids, la taille, le stress, le pH, la quantité de bactéries, l'indice de Shannon, la carie, les dents manquantes et obturées (indice CAO), l'Indice de Loe Sillness (LSI), Indice de Plaque (PI) et saignement au sondage (Bleeding On Probing) (BOP)).

4.1.3 RESULTATS

Un groupe de 33 joueurs de Rugby Professionnels (PRG) et un groupe de 30 sujets témoins (Groupe Contrôle (CG)) ont été recrutés. L'ADN de la salive a été extrait de 46 sujets (24 pour PRG et 22 pour CG). Les données manquantes sur le microbiote étaient dues à des

problèmes techniques lors de l'extraction de l'ADN, à une quantité insuffisante d'ADN ou à un manque de salive.

4.1.3.1 CARACTERISTIQUES DE LA COHORTE

1. L'âge moyen du groupe de joueurs de rugby professionnel (PRG) ($26,97 \pm 4,58$ ans) n'était pas significativement différent ($p = 0,18$) de celui du groupe contrôle (CG) ($26,07 \pm 3,76$ ans) (**Tableau 1**).
2. Le poids corporel moyen ($102,18 \pm 13,86$ kg) et la taille (185 ± 7 cm) du PRG étaient significativement plus élevés que ceux du CG ($76,87 \pm 10,02$ kg et $179 \pm 7,3$ cm, respectivement, avec $p < 0,001$ pour les deux) (**Tableau 1**).
3. L'indice de masse corporelle (IMC) était plus élevé dans le PRG ($29,79 \pm 3,44$ vs $23,96 \pm 3,44$, $p < 0,001$).
4. Bien que non significatif, il y avait une tendance pour le score de stress à être légèrement plus élevé dans PRG par rapport à CG ($3,22 \pm 2,68$ vs $2,67 \pm 1,54$, $p = 0,16$).
5. Le nombre de prises alimentaires et de collations principales était significativement plus élevé dans PRG que dans CG ($3,97 \pm 1,19$ vs $2,86 \pm 0,64$, $p = 0,0002$; $1,39 \pm 0,83$ vs $0,52 \pm 0,60$, $p = 0,0001$, respectivement), comme indiqué dans **Tableau 2**. En particulier, la proportion d'apport en protéines était plus élevée dans le PRG que dans le CG, alors que la proportion de grignotages, ainsi que les prises de sodas et d'alcool était plus faible dans le PRG.

4.1.3.2 SANTE BUCCO-DENTAIRE

Le bilan de la santé dentaire est décrit dans le **Tableau 1** :

1. La fréquence des examens dentaires était significativement plus élevée dans le CG par rapport au PRG ($76,67\%$ vs $42,42\%$, $p = 0,01$) bien que $84,85\%$ des PRG estimaient avoir suffisamment d'informations sur la santé bucco-dentaire (50% pour CG, $p = 0,006$).
2. L'indice CAO était significativement plus élevé dans le PRG ($4,36 \pm 4,59$) par rapport au CG ($2,4 \pm 3,36$, $p = 0,02$), et des scores plus élevés concernant chaque composante de l'indice CAO ont été observés.

3. L'indice de carie significatif (indice SIC) était également plus élevé dans le PRG (9,2) que dans le CG (6,4).
4. Pour compléter le bilan de santé bucco-dentaire, nous avons analysé l'état parodontal. Bien que non significatifs, l'indice de Loe Sillness (LSI), l'indice de plaque (IP) et le saignement au sondage (BOP) avaient tendance à être plus élevés dans le PRG.

Pour chaque groupe, il n'y avait pas de diagnostic de parodontite. Cependant, la gingivite était cinq fois plus fréquente en PRG qu'en CG (Odds Ratio (OR) = 5,16 ; IC à 95% 1,46-21,62).

5. Le pH de la salive était significativement plus élevé en PRG ($7,84 \pm 0,44$) qu'en CG ($7,55 \pm 0,53$).

4.1.3.3 ANALYSES

4.1.3.3.1 Analyse de la composition microbienne taxonomique et fonctionnelle

Nous avons analysé la composition microbienne taxonomique et fonctionnelle pour décrire le microbiote oral chez les joueurs de Rugby professionnels par rapport au groupe témoin. Pour évaluer si les changements observés dans les caractéristiques cliniques orales étaient liés à une dysbiose du microbiote oral, nous avons analysé la quantité et la composition du microbiote oral dans les deux groupes.

Le nombre total de bactéries et la diversité du microbiote oral (selon l'indice de Shannon, $3,32 \pm 0,62$ en PRG vs $3,79 \pm 0,68$ en CG ; $p = 0,03$) étaient significativement diminués en PRG par rapport au CG (**Figure 21 A et B respectivement**).

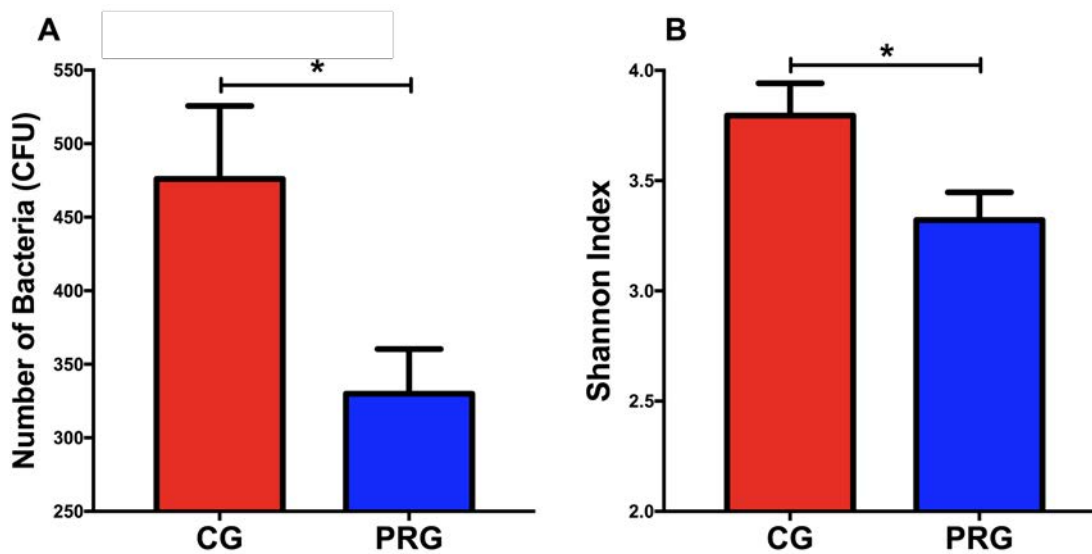
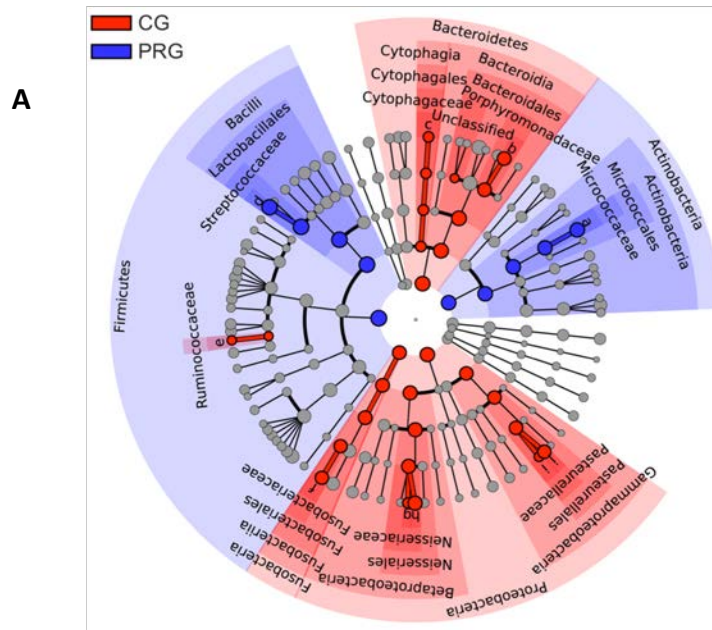


Figure 21: Dysbiose du microbiote salivaire dans le groupe de joueurs de Rugby professionnels comparé au groupe témoin.

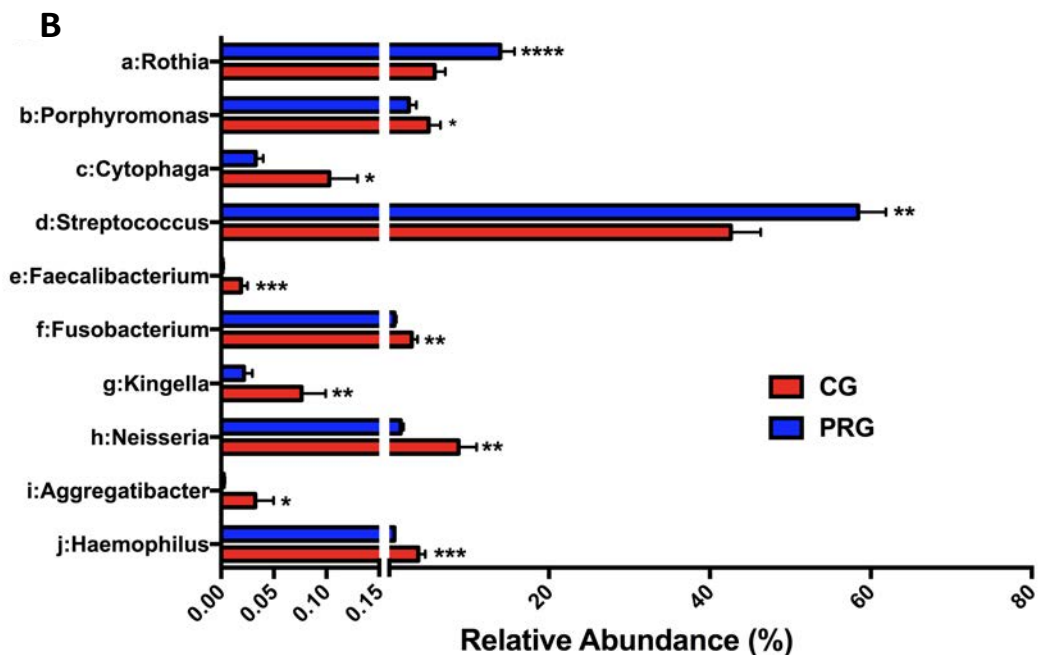
A) Nombre d'UFC (Unités de Formation de Colonies) dans la salive des membres du groupe témoin (CG = control group) et du groupe de joueurs de Rugby (PRG = professional Rugby players group).

B) Alpha-diversité selon l'indice Shannon

Nous observons que *Streptococcus*, le principal genre impliqué dans le processus carieux (144), était significativement plus élevé en PRG ($58,43\% \pm 16,84$ vs $42,60\% \pm 17,45$; $p = 0,005$), tout comme le genre *Rothia* ($13,95\% \pm 8,66$ vs $5,80\% \pm 6,19$; $p < 0,0001$), comme le montre le cladogramme basé sur la taille de l'effet de l'Analyse Discriminante Linéaire (LDA) (LEfSe) et l'histogramme associé (**Figure 22 A et B respectivement**).



A - Cladogramme représentatif du microbiote salivaire ADN 16S



B - Abondance relative en pourcentage selon les deux groupes. (CG versus PRG)

Figure 22: A) Analyse linéaire discriminante (LDA = Linear Discriminant Analysis). Cladogramme représentant l'effet de taille (LEfSe = Effect Size Cladogram) d'une analyse par paire des deux groupes (CG et PRG) des séquences de l'ADN 16S dans la salive. B) Histogramme de l'abondance relative (%) pour des groupes taxonomiques identifiés par des lettres isolées dans le cladogramme (Données indiquées avec un moyen +/- erreur standard moyenne ; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$, test non-apparié de Mann-Whitney et score LDA de 2,0 pour les cladogrammes).

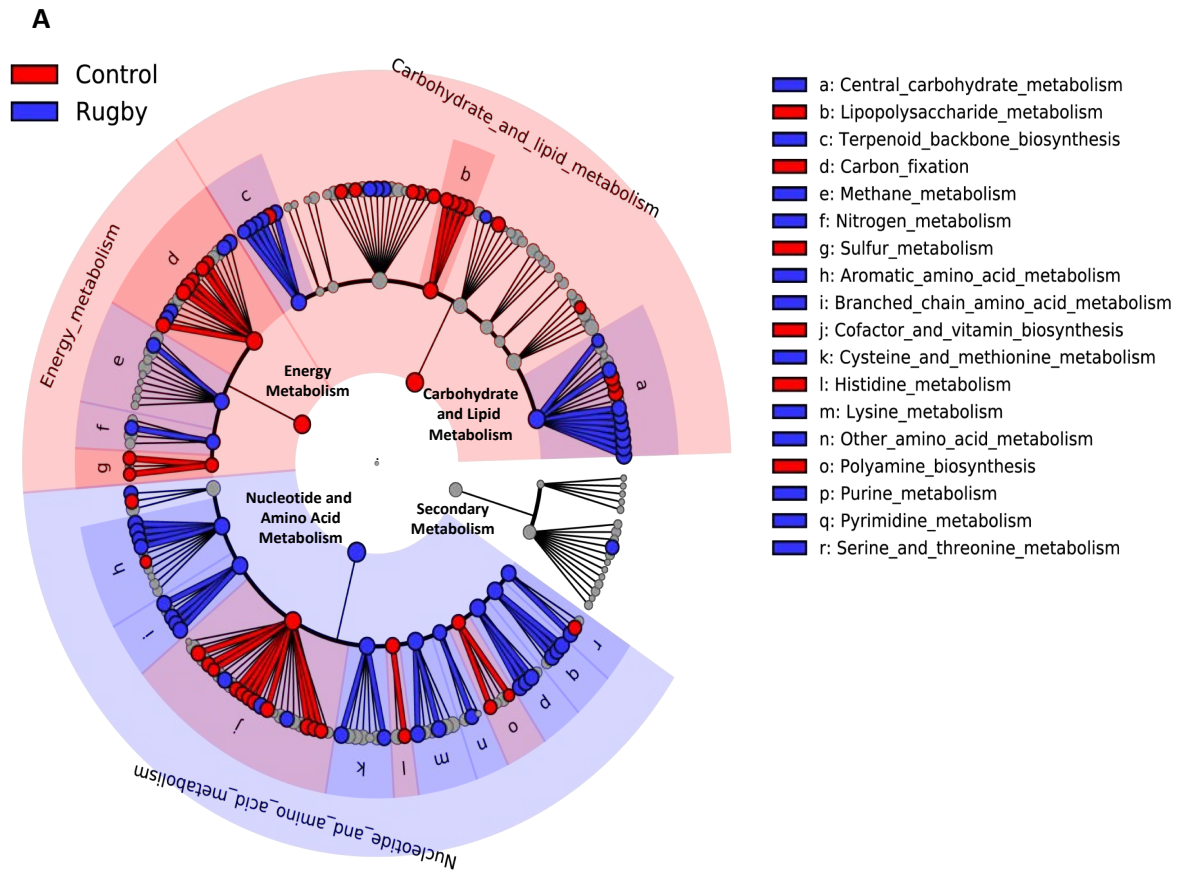
De plus, nous montrons une augmentation pour chaque espèce de *Streptococcus* dans le groupe PRG. En particulier, nous montrons une forte augmentation de l'abondance relative de *S. mutans* ($0,118 \pm 0,212$ en PRG vs $0,03 \pm 0,06$ en CG, multiplication par 3,93), *S. thermophilus* ($2,28 \pm 2,96$ en PRG vs $0,54 \pm 0,72$ en CG, multiplication par 4,22) et *S. sobrinus* ($0,019 \pm 0,065$ dans PRG vs $0,0008 \pm 0,004$ dans CG, multiplication par 23,75), toutes les espèces impliquées dans la carie, et une petite augmentation pour *S. gordonii* ($0,35 \pm 0,42$ dans PRG vs $0,26 \pm 0,23$ en CG, multiplication par 1,34).

En revanche, le microbiote oral dans CG était dominé par les *phyla* des *Proteobacteria* et *Bacteroidetes* par rapport au PRG (**Figure 22 A**).

Pour évaluer si les changements dans les capacités fonctionnelles microbiennes orales pourraient être liés au développement carieux nous avons analysé les métagénomés microbiens prédits du microbiote oral à l'aide de l'algorithme Piphillin (142) (**Figure 23**). Les métagénomés prédits ont été analysés en modules dérivés de KEGG pour les voies métaboliques.

Deux voies majeures ressortent comme potentiellement modulées par rapport à l'état buccal (**Figure 23 A et B**) :

1. La voie centrale du métabolisme des glucides (impliquée dans le métabolisme des glucides dans la cavité buccale) a été augmentée dans le groupe PRG.
2. La voie du métabolisme des lipopolysaccharides a significativement diminué dans le groupe PRG par rapport au CG.



3.

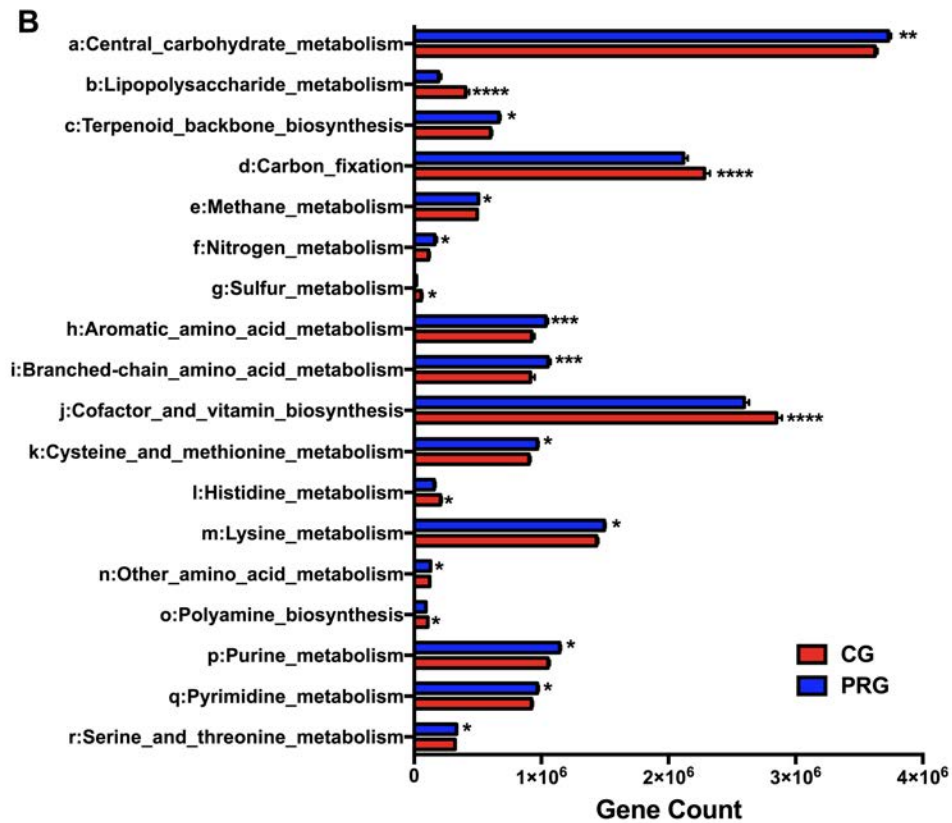


Figure 23: Microbiote « cariogène » dans le groupe PRG comparé au groupe témoin

- A) Cladogrammes (LEfSe) des analyses effectuées « par paire » selon la méthode de Piphillin ont permis de prédire des voies métaboliques microbiennes dans la salive des deux groupes (PRG et CG). Le cladogramme montre la hiérarchie des voies métaboliques selon la classification KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Les taxa à chaque niveau et les modules KEGG sont grisés/colorés selon le groupe dans lequel ils sont les plus abondants.**
- B) Histogramme du comptage des gènes des voies métaboliques microbiennes identifiées par des lettres isolées dans le cladogramme (Données indiquées avec un moyen +/- erreur standard moyenne ; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$, test non-apparié de Mann-Whitney et score LDA de 2,0 pour les cladogrammes).**

Les données globales rapportées ci-dessus montrent que l'état de santé bucco-dentaire spécifique ainsi que le microbiote oral et le microbiome prédit distinguent les sujets PRG et CG. Ainsi, le PRG est associé à un microbiote oral dysbiotique par rapport au CG, favorisant la voie centrale du métabolisme glucidique.

4.1.3.3.2 Analyse multivariée

Une analyse multivariée entre les paramètres cliniques et le microbiote oral chez les joueurs de Rugby professionnels par rapport au groupe témoin a été réalisée par Analyse en Composantes Principales (ACP), en générant une matrice de paramètres microbiens cliniques et oraux pour comprendre la relation entre les deux groupes, **(Figure 24)**.

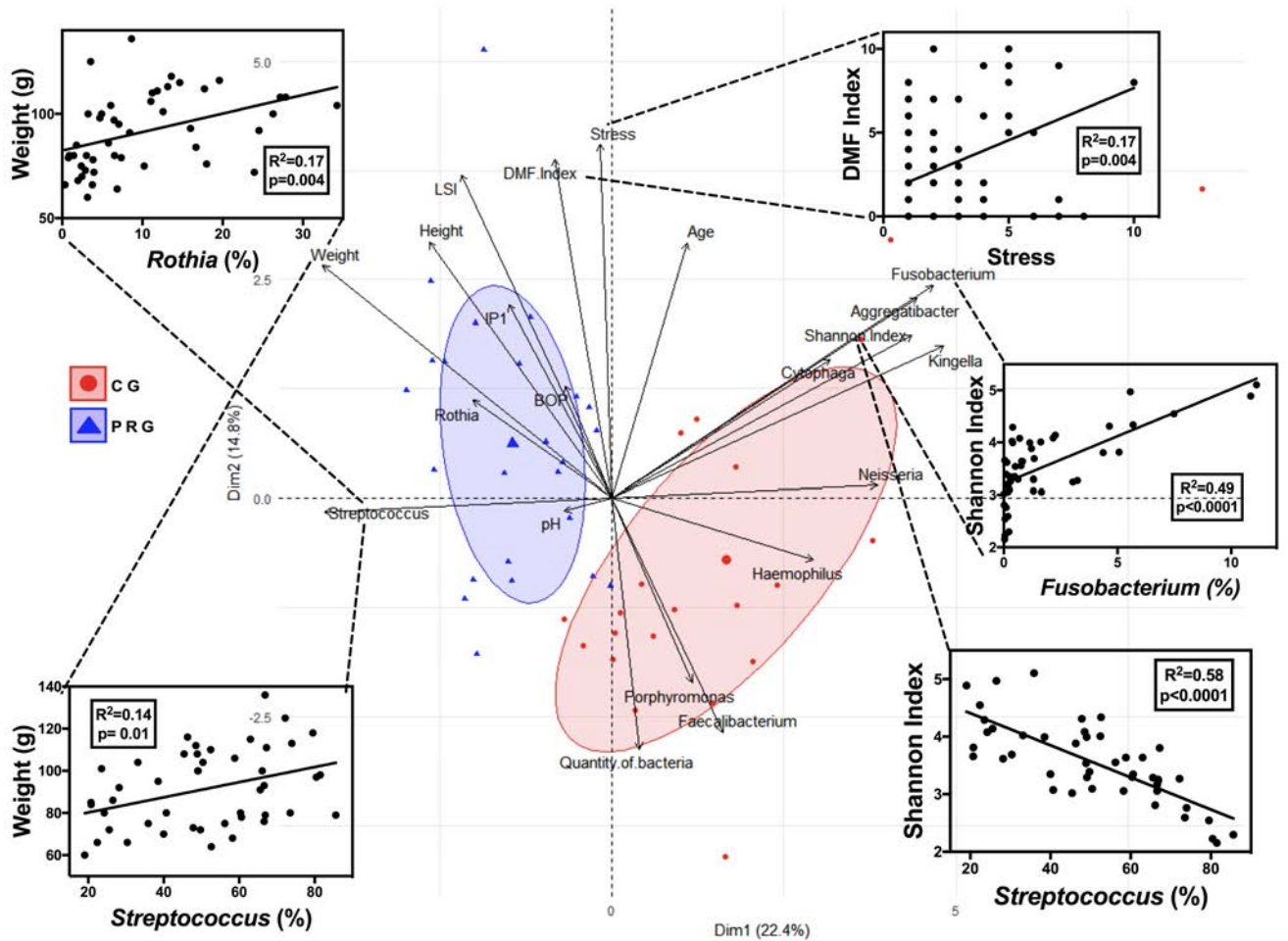


Figure 24: Analyse des composants principaux (PCA = Principal Component Analysis) entre les bactéries du microbiote salivaire, et des paramètres oraux et systémiques

Les paramètres sont : âge, poids, taille, stress, pH de la salive, quantité de bactéries, indice Shannon, Indice CAO, Indice Loe Sillness (LSI), indice de plaque (IP) et saignement au sondage; les cinq encadrés représentent la corrélation entre le poids et le genre Rothia (en haut à gauche); entre le poids et le genre Streptococcus (en bas à gauche); Indice Shannon et le genre streptococcus (en bas à droite); Indice Shannon et le genre Fusobacterium (centre à droite) et Indice DMF et niveau de stress (en haut à droite).

Comme le montre la **Figure 24**, l'Analyse en Composantes Principales (PCA) a identifié un groupe distinct pour chaque groupe de sujets.

1. Une analyse de régression linéaire a montré que l'abondance (%) du genre *Streptococcus* dans le microbiote oral était significativement et négativement corrélée avec la diversité du microbiote oral selon l'indice de Shannon (Figure 24, encadré en bas à droite).
2. En revanche, l'abondance de *Fusobacterium* (%) était significativement et positivement corrélée à la diversité du microbiote oral (Figure 24, encadré, au centre à droite).
3. De plus, les abondances de *Rothia* et de *Streptococcus* (%) étaient significativement et positivement corrélées avec le poids corporel (Figure 24, encadré en haut à gauche et en bas à gauche, respectivement) et nous avons trouvé une corrélation significative et positive entre le stress et l'indice DMF (Figure 24, encadré en haut à droite).

Puis, nous avons analysé les données rapportées ci-dessus en séparant les sujets PRG selon leur position dans un match de Rugby : Les joueurs des lignes arrière (back) (PRG-B) et les avants (forward) (PRG-F). Cette séparation est basée sur le fait que les joueurs de Rugby sont constitués de deux schémas squelettiques différents, les joueurs des lignes arrière étant plus légers que les avants.

Nous constatons que les sujets PRG-B vs PRG-F montrent une santé orale globale, très similaire sans différence spécifique dans les paramètres cliniques. Cependant, les sujets PRG-F avaient une numération bactérienne de la salive significativement plus faible par rapport à CG (**suppl. Figure 1 A**) ; alors que les sujets PRG-B avaient une α -diversité salivaire significativement plus faible que CG (**suppl. Figure 1 B**).

- ✓ Sur une base taxonomique, nous n'avons pas pu identifier de taxons bactériens oraux spécifiques à chaque groupe, en fonction de la position du joueur de Rugby. La parenté de tous les sujets, basée sur le statut du microbiote oral au niveau de l'espèce, était similaire quelle que soit la position dans le jeu.
- ✓ Sur une base fonctionnelle, nous avons analysé les voies microbiennes fonctionnelles du microbiote oral en effectuant une analyse à base de Piphillin (142) du microbiome oral dans les groupes séparés de PRG-B (Backs – (Arrières)) vs PRG-F, (Forwards –

(Avants)). Nous n'avons pas constaté de fonctions bactériennes orales spécifiques à chaque groupe en fonction de la position du joueur de Rugby (*suppl. Figure 2*).

- ✓ Ensuite, nous avons effectué une Analyse en Composantes Principales (ACP) pour déterminer si certains paramètres caractérisent mieux les groupes PRG-B vs PRG-F (*Figure 25*). En fait, les sujets PRG-B et PRG-F montrent un statut oral très similaire, sans microbiote oral spécifique.

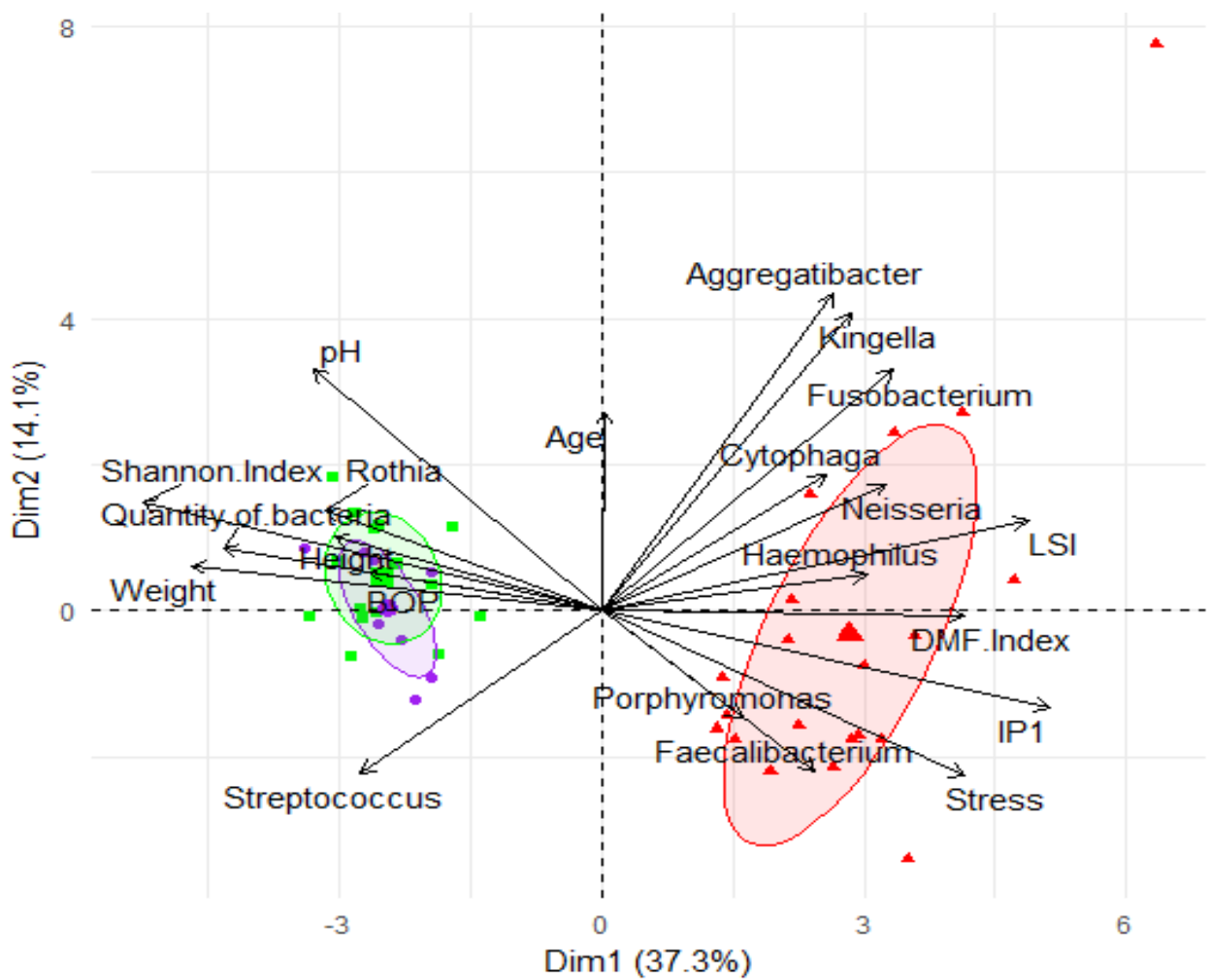


Figure 25: Analyse en Composantes Principales (ACP) pour déterminer si certains paramètres caractérisent mieux les groupes (PRG-B vs PRG-F) et CG.

4.1.4 DISCUSSION

A notre connaissance, nous montrons ici la première relation entre l'indice CAO et le microbiote oral chez les Joueurs de Rugby Professionnels. Nous avons caractérisé chez les joueurs de Rugby un microbiote oral dysbiotique dominé par *Streptococcus* et notamment *Streptococcus mutans* et *Streptococcus thermophilus*, qui peut favoriser le développement des caries.

Nous montrons ici que la forte incidence des caries, qui avait été précédemment observée chez d'autres athlètes d'élite (117), (118), (120), est également vraie chez les joueurs de Rugby.

Cet état carieux serait dû à une mauvaise santé bucco-dentaire des athlètes d'élite, principalement en raison de spécificités nutritionnelles telles que le nombre accru de repas riches en glucides.

Cette mauvaise santé bucco-dentaire serait renforcée par les altérations connues de la réponse immunitaire (145). En lien de causalité avec la déficience immunitaire et les changements dans les habitudes alimentaires, nous montrons également ici pour la première fois que les joueurs de Rugby sont caractérisés par une dysbiose du microbiote buccal. Surtout, nos résultats sont en accord avec l'identification récente de la dysbiose du microbiote intestinal des athlètes (146).

La cavité buccale présente un microbiote bactérien complexe et multiple avec une grande diversité d'environ 450 espèces à l'âge adulte (147). *Rothia*, *Prevotella*, *Streptococcus* et *Fusobacterium* sont les genres les plus courants dans le microbiote oral et la perturbation de leur équilibre pourrait induire des maladies locales et systémiques (148). Le maintien de cette diversité produit divers métafacteurs bactériens immunitaires qui contribuent à une symbiose entre le microbiote buccal et le tissu buccal (149).

L'augmentation de la proportion de streptocoques, montrée dans nos données, est l'une des premières étapes du développement de lésions carieuses. Le streptocoque provoque un biofilm pathogène spécifique, responsable du développement de lésions carieuses (130). Fait intéressant, la métagénomique prédite montre un nombre accru de gènes bactériens liés au métabolisme des glucides suggérant un rôle pour les produits de ces gènes chez les joueurs de Rugby en raison de leur consommation fréquente de sucres alimentaires.

Par conséquent, cela favoriserait la proportion accrue de streptocoques dans le microbiote oral en tant que facteur de risque de développement carieux. Certaines bactéries opportunistes pour les caries comme *Streptococcus mutans* ont une collection spécifique de facteurs de virulence, leur permettant d'envahir le tissu dentaire et par la suite d'induire des caries. De plus, *Streptococcus* favorise l'adhérence d'autres bactéries cariogènes au biofilm dentaire en produisant des polysaccharides extracellulaires. À l'intérieur du biofilm cariogène, *Streptococcus mutans* possède de nombreux complexes enzymatiques capables de métaboliser les sucres des aliments (150). L'augmentation de l'activité de ces enzymes, métabolisant les glucides et la présence de ces enzymes dans le microbiome buccal des joueurs de Rugby, peut produire des acides qui altèrent les minéraux des dents (151). De plus, nous avons noté une augmentation du pH de la salive qui pourrait modifier le microenvironnement des bactéries favorisant un microbiote dysbiotique (41). Finalement, l'immunosuppression locale et systémique appelée «fenêtre ouverte» telle que décrite dans la pratique sportive intensive (127) pourrait également être à l'origine de la dysbiose du microbiote oral. Par conséquent, cela affecterait l'homéostasie buccale et favoriserait le développement de maladies bucco-dentaires comme les caries (17). Ainsi, nos résultats suggèrent qu'une coalition de facteurs de risques pourrait favoriser les caries chez les athlètes d'élite : une dysbiose du microbiote oral caractérisée par un rapport élevé de bactéries cariogènes par rapport aux bactéries non cariogènes, une augmentation de l'apport en sucre et une réaction immunitaire altérée.

4.1.5 CONCLUSIONS

Pour la première fois, notre étude décrit la mauvaise santé bucco-dentaire chez les joueurs de Rugby Professionnels. Les joueurs de Rugby ont plus fréquemment des caries dentaires et des gingivites qui pourraient être liées à un microbiote oral dysbiotique.

Nous avons identifié dans le PRG une augmentation de *Streptococcus*, le principal genre associé aux caries. De plus, la consommation plus élevée de viande et de glucides chez les sportifs professionnels pourrait expliquer la perturbation du microbiote buccal.

Une bonne santé bucco-dentaire et un équilibre dentaire optimal sont importants dans la population générale et plus encore chez les sportifs pour ne pas impacter leurs performances. Il est essentiel de protéger la santé dentaire et de prévenir l'attaque acide produite par les bactéries des caries. Une bonne gestion du parodonte reste essentielle pour l'entretien des dents.

La maladie parodontale se développe souvent silencieusement, sans douleur, et le diagnostic tardif peut entraîner des dommages irréversibles tels que la perte osseuse. Nous pouvons proposer une prévention avec des actions simples pour protéger la santé bucco-dentaire. Nous proposons que les joueurs de Rugby Professionnels augmentent la fréquence de brossage en raison de l'augmentation du nombre de repas, comme déjà montré (152), et qu'ils utilisent du fil dentaire ciblant les zones inter-proximales, des préparations à haut niveau de fluorure (153) qui induisent une minéralisation de l'émail, et des actions antibactériennes pour réduire la sensibilité des cavités. Pour gérer et / ou limiter la dysbiose, des stratégies utilisant des probiotiques (par exemple à base de *Lactobacillus*, le principal genre connu pour protéger contre les caries) (154) et des prébiotiques, pourraient aider à contrôler l'augmentation des streptocoques dans le microbiote buccal.

Un examen dentaire régulier par exemple semestriel, pour le joueur professionnel de Rugby devrait être organisé au niveau des ligues nationales et des clubs de Rugby. Le dépistage dentaire doit être inclus dans le suivi médical des Rugbymen professionnels dans le cadre de leur prise en charge sanitaire.

En conclusion, la prévention et la détection des maladies bucco-dentaires sont essentielles pour éviter leurs effets délétères sur la santé systémique et par conséquent sur les performances sportives. À cet effet, l'analyse du microbiote buccal peut être prédictive d'une nouvelle détérioration de la santé bucco-dentaire et de la santé générale.

4.2 RESULTATS EXPERIMENTAUX (II)

**DIFFERENCES LIEES AU GENRE DANS LE MICROBIOTE ORAL ET DANS LES PARAMETRES
BIOCHIMIQUES SALIVAIRES EN REPONSE A L'ALIMENTATION**

**Gender-associated differences in oral microbiota and salivary biochemical parameters in
response to feeding**

M. Minty, P. Loubières, T. Canceil, V. Azalbert, R. Burcelin, F. Tercé, V. Blasco-Baque

J Physiol Biochem, 2020 Jul 9. doi: 10.1007/s13105-020-00757-x.

4.2.1 INTRODUCTION

Tous les composants de la salive contribuent aux fonctions orales telles que la mastication, le goût, la déglutition, la digestion et la protection immunitaire. La sécrétion de salive par les glandes salivaires parotides et sublinguales joue un premier rôle clé dans l'absorption et la digestion des aliments, principalement par la présence d'enzymes (155). L'amylase salivaire initie la digestion de l'amidon, la lipase linguale commence la digestion des graisses et une grande variété d'autres enzymes protègent contre les agents pathogènes et les bactéries communales. La salive étant le biofluide le plus simple à collecter de manière non invasive, il est intéressant d'évaluer son potentiel dans le diagnostic ou le suivi des pathologies bucco-systémiques, donnant une image de santé systémique (156).

Au cours des dernières années, il a été démontré que le microbiote, une population complexe et dynamique de micro-organismes, présent dans un certain nombre d'organes et de tissus, joue un rôle symbiotique dans la modulation de la santé humaine (157).

Principalement étudiée dans l'intestin, la composition du microbiote est spécifique de chaque organe. L'un des microbiotes les plus importants et les plus divers se trouve dans la bouche, à l'interface avec le monde extérieur. Des études récentes ont clairement montré que le microbiote oral communique largement avec l'organisme via les bio-fluides et peut, par exemple, être modulé par des pro- ou prébiotiques pour améliorer la glycémie à jeun chez les patients diabétiques (158).

Les composants bactériens individuels du microbiote peuvent être considérés comme des «biomarqueurs» et l'analyse du microbiote oral (par séquençage de l'ADN par exemple) peut permettre, par exemple, une identification précoce de bactéries spécifiques associées au diabète. Un grand intérêt s'est donc porté sur le rôle du microbiote dans le développement de maladies systémiques.

Des différences de genre ont été mises en évidence dans la sensibilité à certaines maladies, mais ces différences restent néanmoins largement ignorées dans les traitements thérapeutiques (159). Ces différences, vues à la fois dans les maladies chroniques métaboliques et dans les maladies neuropsychiatriques (160), ont été initialement attribuées aux effets différentiels des hormones sexuelles. Mais divers autres facteurs liés au genre, liés aux gènes du chromosome X (161) et au microbiote genre-spécifique (162) sont

maintenant considérés être des facteurs de risque pour le diabète. Les différences entre les sexes liées à la gravité du diabète (163) et au microbiote différentiel (164) pourraient être, en partie, une conséquence des habitudes alimentaires (165).

Les différences liées au genre observées après un repas (166) devraient être davantage étudiées pour évoluer vers une «médecine personnalisée» (167).

L'objectif principal de ces travaux était de mettre en place une étude pilote pour comparer le microbiote oral et les paramètres salivaires entre hommes et femmes en réponse à un repas. Pour démontrer le lien genre-spécifique entre le microbiote oral et le statut alimentaire, nous avons analysé les paramètres biologiques de la salive ainsi que la composition détaillée du microbiote sur une cohorte de 20 sujets (10 femmes / 10 hommes) avant ou après une prise alimentaire.

4.2.2 MATERIELS ET METHODES

4.2.2.1 CRITERES DE CONCEPTION ET D'ADMISSIBILITE A L'ETUDE

Les auteurs de cette étude attestent que chaque participant a donné son consentement éclairé pour sa participation et son accord pour un examen oral et des analyses biologiques de la salive et de la plaque dentaire.

Tous les sujets sélectionnés devaient rédiger et signer un formulaire de consentement donnant leur accord à la suite d'une information claire sur les lignes directrices et le cours de l'étude. Ainsi, les personnes ont accepté de participer après avoir reçu les informations claires et détaillées de ce projet.

Les critères de sélection de cette étude observationnelle étaient les suivants :

1. Être un sujet sain
2. Être d'accord pour l'examen oral et les analyses biologiques relatives à la salive et à la plaque dentaire.
3. Avoir parfaitement compris le formulaire de consentement et l'avoir signé pour participer à cette étude.

Notre étude comprenait 20 sujets (10 femmes et 10 hommes) de la même zone géographique et d'un niveau d'éducation semblable. La moyenne d'âge était de 23,6 ans pour les femmes et de 24,1 ans pour les hommes.

Les critères d'exclusion à cette étude étaient la présence de toute maladie systémique ou de trouble de la glande salivaire qui pourrait avoir un effet négatif sur la santé bucco-dentaire (par exemple : une défaillance métabolique, une insuffisance cardiopulmonaire, toute infection, une radiothérapie ou chimiothérapie en cours) ou l'utilisation d'antibiotiques jusqu'à 3 semaines avant l'analyse (168).

Tous les fumeurs ont été exclus de l'étude pour limiter les biais liés au tabac.

4.2.2.2 COLLECTE DES DONNEES

Les données ont été collectées le 13 mai 2017 et les sujets ont été examinés au service dentaire du CHU de Toulouse (France).

Tous les examens et données ont été collectés dans les mêmes conditions procédurales, y compris un test sanguin à jeun et un échantillon salivaire à 8h00 et un test sanguin postprandial suivi d'un prélèvement salivaire à 14h00. Nous avons également recueilli des données sur l'état de santé bucco-dentaire (indice CAO et état gingival) et les habitudes alimentaires.

4.2.2.3 CARACTERISTIQUES MEDICALES ET SOCIODEMOGRAPHIQUES.

Des efforts pour réduire les biais potentiels ont été faits en collectant diverses informations (169) :

- ✓ Nous avons analysé la quantité, la fréquence et le type de prise alimentaire à l'aide de questionnaires standardisés (**Tableau 3**) pour évaluer si les différences constatées dans le microbiote oral et les maladies bucco-dentaires pouvaient être liées aux habitudes alimentaires (162) .
- ✓ Nous avons enregistré la qualité de vie sur une échelle de 10 points (170) et tous les participants avaient un score supérieur à 6.
- ✓ Nous avons également inclus des questions sur le nombre de visites par an chez le dentiste et le niveau de stress, noté sur une échelle de 10 points (**Tableau 4**).

4.2.2.4 CARACTERISTIQUES DE SANTE BUCCO-DENTAIRE

Les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé ont été utilisés pour diagnostiquer l'état de la carie avec l'index CAO (de chaque participant (135)) conformément aux directives de l'OMS sur l'examen clinique dans les études épidémiologiques.

http://www.who.int/oral_health/publications/9789241548649/en/

L'état gingival a été évalué à l'aide de l'indice de Loe and Sillness (LSI), de l'indice de plaque (IP) et des saignements au sondage (BOP) (137). Deux dentistes qualifiés ont effectué les examens de santé bucco-dentaire. Avant le test, les examinateurs ont vérifié qu'ils avaient exactement le même protocole pour l'examen clinique.

4.2.2.5 PRELEVEMENT SALIVAIRE

Pour évaluer correctement la composition du microbiote oral et éviter la contamination par les aliments, nous avons nettoyé la bouche des participants pendant 1 minute avec de l'eau stérile. Les sujets n'avaient pas mangé, ni bu 2 heures avant le prélèvement salivaire qui a été obtenu entre 09h00 et 10h00 pour les conditions de jeûne.

Le prélèvement de la salive a été obtenu une heure après le déjeuner pour les conditions d'alimentation. La salive a été prélevée après avoir mâché un bloc de paraffine stérile pendant 1 minute et a été recueillie dans des tubes stériles le même jour pour les deux conditions rapportées précédemment (171).

Ensuite, une partie de la salive a été directement utilisée pour la culture bactérienne et le reste a été congelé sous glycérol 50% puis conservé à -80° C pour l'analyse taxonomique du microbiote oral.

4.2.2.6 ANALYSE DU MICROBIOTE ORAL

Le microbiote oral a été analysé selon deux procédures différentes : la culture bactérienne pour déterminer le nombre de bactéries vivantes et le séquençage de l'ADNr16S pour définir la composition bactérienne.

4.2.2.6.1 Culture bactérienne

Pour la culture bactérienne, après une agitation de 30 s, les échantillons de salive ont été dilués dans du bouillon Wilkins-Chalgren (WC, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-

Uni). Des dilutions appropriées de salive (10^{-4} et 10^{-5}) ont été étalées sur des plaques de gélose au sang de mouton défibriné, stérile, non sélectif à 5% (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) supplémentées avec 0,0002% de bisulfite de sodium de menadione et 0,4% chlorure de Hemin pour la numération bactérienne aéro / anaérobie totale.

Les plaques d'agar sont incubées pendant 5 jours à 37 °C (138). Le comptage des bactéries aérobies a été effectué selon les critères du Bergey's manual (140).

4.2.2.6.2 Analyse taxonomique du microbiote oral

Pour l'analyse taxonomique du microbiote oral : L'ADN total a été extrait de la salive congelée en utilisant un kit QiAamp Cador Pathogen Mini (réf 54106) de QIAGEN.

Par la suite, les régions hypervariables V2 à V4 de l'ADN ribosomal bactérien 16S (ADNr 16S) ont été analysées à des fins de taxonomie. Les régions hypervariables V2-V4 de l'ADNr 16S ont été amplifiées et séquencées en utilisant la technologie Illumina-MiSeq (2x300 pb).

En bref, après démultiplexage des lectures appariées Illumina à code-barres, des séquences de lecture uniques ont été nettoyées et appariées en fragments plus longs pour chaque échantillon indépendamment.

La technique MiSeq a été appliquée pour générer en moyenne 10 000 séquences par échantillon par le Laboratoire Vaiomer (31670 Labège France).

4.2.2.7 ANALYSES BIOCHIMIQUES

Les taux de triglycérides, de glucose, de protéines totales, d'acides gras libres, d' α -amylase, de cholestérol et de lipase ont été déterminés dans la salive au moyen de la plateforme de Phénotypage Anexplo-Crefre, mise à disposition de la communauté scientifique de Toulouse-Rangueil en utilisant l'analyseur biochimique Pentra 400 (Horiba ABX, Kyoto, Japon).

4.2.2.8 GESTION ET ANALYSE DES DONNEES

4.2.2.8.1 Pipeline bio-informatique

Les relevés MiSeq métagénomiques ciblés 16S à partir des échantillons oraux ont été analysés à l'aide du pipeline bio-informatique établi par Vaiomer sur la base de l'outil FROGS v1.4.0 (172).

En bref, après démultiplexage des lectures appariées «Illumina» à code-barres, les séquences de lecture R1 et R2 ont été coupées de 10 et 40 bases respectivement pour enlever les bases de qualité inférieure. Des lectures propres ont été appariées pour chaque échantillon indépendamment en fragments plus longs à l'aide de FLASH.

Les amplicons résultants ont été nettoyés en supprimant les amplifications non spécifiques, c'est-à-dire les fragments de moins de 350 et plus de 500 bases, ou sans les deux séquences d'amorce PCR (10 % d'inadéquations autorisées).

Les unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) ont été produites par regroupement à liaison unique à l'aide de l'algorithme Swarm v2.1.6 en deux passages : la première passe est un regroupement avec une distance d'agrégation égale à 1 et la seconde passe avec une distance d'agrégation égale à 3. Les OTUs identifiés comme chimères (avec VSEARCH v1.9.5) dans tous les échantillons dans lesquels ils sont présents, ont été enlevés. Les OTUs dont l'abondance est inférieure à 0,005 % de l'abondance totale des ensembles de données ont été supprimés.

Enfin, une attribution taxonomique a été effectuée afin de déterminer les profils communautaires à l'aide de Blast+ v2.2.30+ par rapport à la banque de données Silva 128 Parc.

4.2.2.9 ANALYSES STATISTIQUES

Les données statistiques ont été analysées en aveugle pour maintenir la confidentialité des participants. Les analyses statistiques ont été corrigées par le «faux taux de découverte» (FDR), une méthode de conceptualisation du taux d'erreurs de type I dans les tests d'hypothèses nulles lors de multiples comparaisons (173).

Les analyses de la diversité bactérienne (diversité alpha Chao1 et diversité bêta de Bray-Curtis) ont été réalisées à l'aide de l'ensemble Phyloseq v1.14.0 R.

Les analyses différentielles des taxa ont été réalisées à l'aide de l'outil linéaire de taille de l'effet d'analyse discriminant LEfSe (141) à l'aide de paramètres par défaut (seuil de signification des paramètres alpha fixé à 0,05 et seuil de score logarithmique de LDA fixé à 2,0).

Des tests Mann-Whitney non appariés, ont été effectués à l'aide du GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Un test PERMANOVA a été effectué avec 999

permutations pour évaluer la signification statistique de la différence entre les groupes dans les analyses PCoA de la diversité bêta (**Figures 26B, 27B et 28 B**).

Des tests de corrélation linéaire ont été effectués à l'aide de GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) pour trouver des relations statistiques entre le niveau de changement glycémique (le rapport glycémie nourri / glycémie à jeun) et microbiote oral (**Suppl. Figure 3**) ou avec d'autres paramètres biologiques comme le changement de taux de lipase (**Suppl. Figure 4**).

4.2.2.10 TYPES D'ANALYSES EFFECTUEES

Afin de détecter une éventuelle corrélation entre les paramètres biochimiques, les facteurs microbiologiques de la salive et la glycémie (comme critère du diabète), trois types d'analyses ont été réalisées : métaboliques (cholestérol, glucose, triglycérides...), enzymatiques (protéine totale, amylase, lipase...) et microbiologiques.

4.2.3 RESULTATS

Un groupe de 10 hommes et 10 femmes ont été recrutés pour un examen clinique et un prélèvement de salive avant et après avoir mangé (prise alimentaire). Leur microbiote (suite à l'extraction d'ADN) et leurs paramètres biologiques ont été ensuite analysés.

4.2.3.1 CARACTERISTIQUES DES PARTICIPANTS

Le **Tableau 4** présente les caractéristiques des participants selon les critères préalablement définis dans le paragraphe 4.2.2 «Matériels et Méthodes».

Comme indiqué, l'âge moyen des sujets était de 23,90 ans ($\pm 2,14$), avec une taille de 169,95 cm ($\pm 9,03$) et un poids de 61,28 kg ($\pm 12,42$). L'âge moyen était similaire pour les hommes et les femmes ($23,67 \pm 1,12$ vs $24,08 \pm 2,60$ $p = 0,82$).

Comme prévu, des différences significatives ont été observées entre les hommes et les femmes au niveau de leur poids ($72,33 \text{ kg} \pm 10,74$ vs $53,00 \text{ kg} \pm 4,51$, $p < 0,0001$) et de leur taille ($178,00 \text{ cm} \pm 6,36$ vs $163,92 \text{ cm} \pm 4,91$, $p = 0,0003$).

Le score de stress était également plus élevé pour les femmes que pour les hommes ($3,17 \pm 1,91$ vs $1,22 \pm 0,44$, $p = 0,0031$).

Aucune différence significative n'a été observée pour les habitudes alimentaires chez les hommes et les femmes, à l'exception d'un apport plus élevé en soda pour les hommes (**Tableau 3**).

4.2.3.2 SANTE BUCCO-DENTAIRE

Différents paramètres ont été analysés pour déterminer l'état de santé bucco-dentaire des participants (**Tableau 4**). L'indice CAO (Cariées, Absentes, Obturées) de la cohorte globale était de $0,80 \pm 0,92$ et n'était pas significativement différent entre les hommes et les femmes.

1. Concernant l'état gingival, le saignement au sondage (BOP) ($1,33 \pm 0,86$ vs $1,41 \pm 1,25$, $p = 0,87$) et l'indice de plaque (IP) ($1,11 \pm 1,05$ vs $1,17 \pm 0,79$, $p = 0,89$) n'étaient pas significativement différents entre hommes et femmes, ce qui pourrait refléter le même nombre de brossages par jour ($2,11 \pm 0,33$ vs $2,29 \pm 0,43$, $p=0,2927$) et le même temps de brossage (en min) ($1,78 \pm 0,26$ vs $1,90 \pm 0,35$, $p = 0,11$).
2. Il n'y avait aucun diagnostic de parodontite dans les groupes étudiés.
3. Deux paramètres étaient significativement plus élevés chez les femmes : la fréquence des examens dentaires au cours des 12 derniers mois ($0,64 \pm 0,28$ vs $1,25 \pm 0,56$, $p = 0,0111$) et le score de stress ($1,22 \pm 0,44$ vs $3,17 \pm 1,91$, $p = 0,0031$).

4.2.3.3 ANALYSES BIOLOGIQUES

4.2.3.3.1 Comparaison entre à jeun et nourri

Pour déterminer l'état biologique de la salive après l'alimentation, nous avons mesuré le niveau de différents métabolites et d'enzymes, d'abord après une période de jeûne de 16 heures et puis 2 heures après la prise alimentaire (**Tableau 5**).

Les résultats montrent que les paramètres liés aux lipides de la salive ont diminué après l'alimentation. Cela était très significatif pour les acides gras libres (AGL, $0,15 \text{ mmol / L} \pm 0,15$ vs $0,07 \text{ mmol / L} \pm 0,07$, $p = 0,0078$) et le cholestérol ($0,53 \text{ mmol / L} \pm 0,30$ vs $0,15 \text{ mmol / L} \pm$

0,14, $p < 0,0001$), ainsi que les protéines salivaires totales ($13,2 \text{ g / L} \pm 4,31$ vs $9,02 \text{ g / L} \pm 6,98$, $p = 0,0168$) (**Tableau 5**).

+On note que le niveau de lipase salivaire a également diminué après l'alimentation ($27,89 \text{ U / L} \pm 25,7$ vs $12,28 \text{ U / L} \pm 4,85$, $p = 0,0126$). Comme prévu, le repas a induit une augmentation de la glycémie ($87,42 \text{ mg / dL} \pm 7,46$ vs $110,71 \text{ mg / dL} \pm 21,82$, $p < 0,0001$).

4.2.3.3.2 Comparaison entre hommes et femmes à l'état à jeun et nourri

Lors de l'étude des différences liées au genre, comme indiqué dans le **Tableau 6**, le taux de glycémie n'était pas différent entre les hommes et les femmes à jeun ($88,00 \text{ mg / dL} \pm 6,38$ vs $87,00 \text{ mg / dL} \pm 8,07$, $p = 0,9149$) ou à l'état nourri ($102,44 \text{ mg / dL} \pm 14,03$ vs $116,9 \text{ mg / dL} \pm 25$, $p = 0,1362$). Comme prévu, la glycémie a augmenté après l'alimentation chez les hommes ($88,00 \text{ mg / dL} \pm 6,38$ vs $102,44 \text{ mg / dL} \pm 14,03$, $p = 0,0084$) et les femmes ($87,00 \text{ mg / dL} \pm 8,07$ vs $116,91 \text{ mg / dL} \pm 25$, $p = 0,0021$). A noter que les hommes à jeun ont montré un taux de cholestérol ($0,71 \text{ mmol / L} \pm 0,26$ vs $0,40 \text{ mmol / L} \pm 0,27$, $p = 0,0329$), FFA ($0,25 \text{ mmol / L} \pm 0,18$ vs $0,08 \text{ mmol / L} \pm 0,06$, $p = 0,0049$) et des triglycérides ($0,24 \text{ mmol / L} \pm 0,15$ vs $0,09 \text{ mmol / L} \pm 0,04$, $p = 0,006$) plus élevés que les femmes, mais ces différences n'ont pas été observées à l'état nourri. Enfin, la lipase salivaire ($35,10 \text{ U / L} \pm 27,52$ vs $12,97 \text{ U / L} \pm 4,29$, $p = 0,0484$) et les taux de cholestérol ($0,71 \text{ mmol / L} \pm 0,26$ vs $0,12 \text{ mmol / L} \pm 0,073$, $p = 0,002$) ont diminué chez les patients nourris uniquement pour les hommes.

4.2.3.4 ANALYSE DE LA COMPOSITION TAXONOMIQUE DU MICROBIOTE ORAL

Nous avons ensuite analysé la composition du microbiote oral dans les deux groupes à l'état jeun et nourri (**Tableau 7**).

1. La diversité alpha du microbiote oral était significativement plus élevée à l'état nourri qu'à jeun ($58,99 \pm 7,17$ vs $63,27 \pm 6,23$, $p = 0,0171$ pour l'indice de Chao) (**Tableau 7**).
2. De même, la diversité bêta était significativement différente entre nourri et à jeun ($p = 0,029$) (**Figure 26 B**).

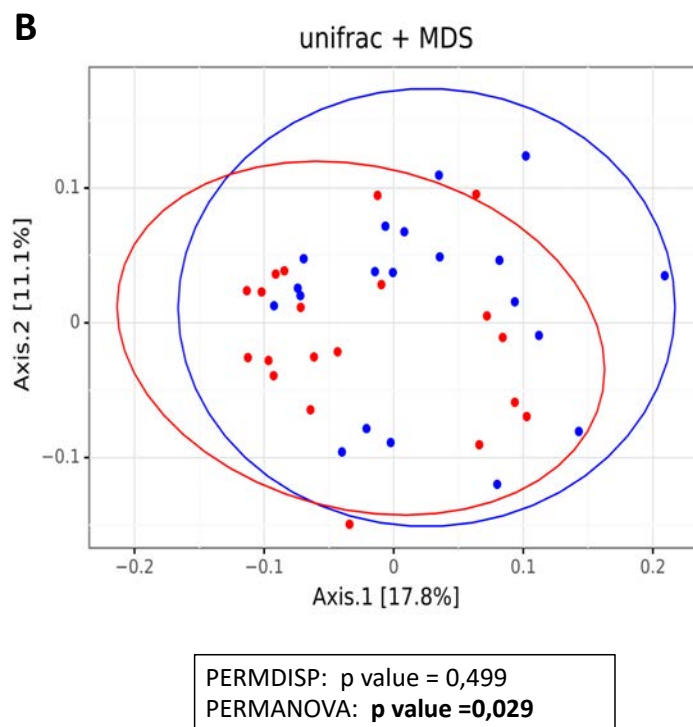
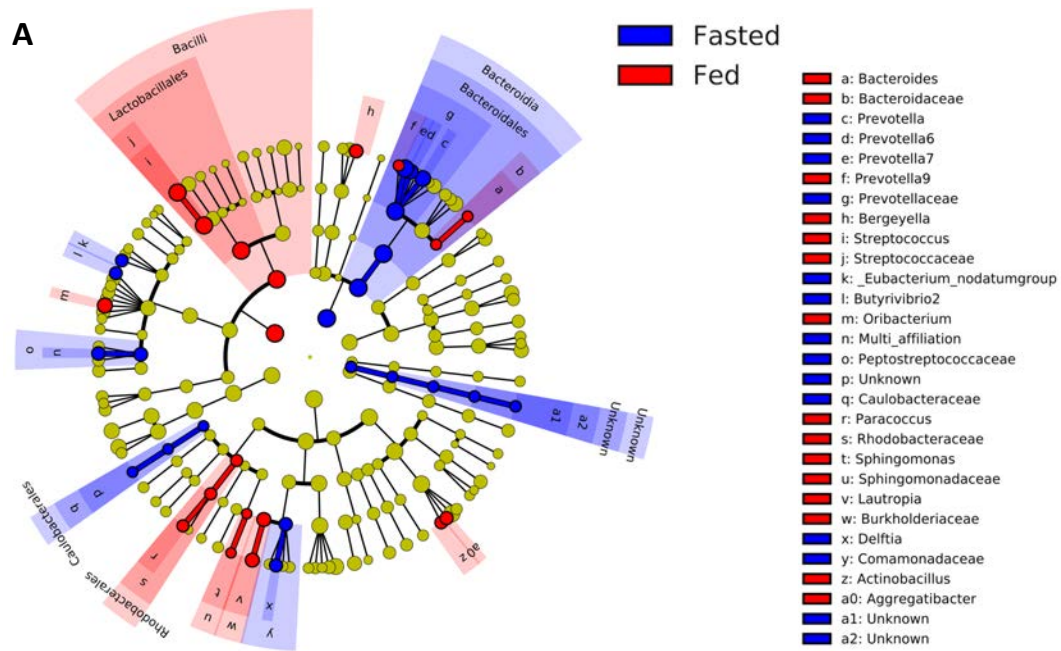


Figure 26: Microbiote oral (salive) avant et après la prise alimentaire chez tous les sujets

A : Cladogramme basé sur l'analyse du microbiote oral de l'état à jeun comparé à l'état nourri de tous les sujets pour l'analyse de séquence de l'ADN 16S des échantillons de salive.

B : Représentation Unifrac de la diversité bêta entre les conditions à jeun et nourries. Un PERMDISP et un test PERMANOVA ont été effectués avec 999 permutations pour évaluer la différence entre les conditions de jeûne et nourries dans les analyses PCoA de diversité bêta

4. En regardant l'abondance relative des espèces bactériennes, la famille des *Streptococcaceae* était surexprimée en condition nourrie ($24,56\% \pm 9,32$ vs $13,53\% \pm 7,47$, $p < 0,0001$ *** / p corrigé = $0,00055$) et représentait l'essentiel du microbiote oral de tous les sujets après l'alimentation.
5. En outre, certains genres étaient significativement surexprimés dans la condition nourrie, comme *Oribacterium* ($2,14\% \pm 1,42$ vs $1,12\% \pm 0,04$, $p = 0,004$ / p corrigé = $0,0123$) (**Tableau 7**).
6. Ces augmentations se sont faites au détriment des *Prevotellaceae*, la principale famille à jeun, qui est diminuée après alimentation ($34,45\% \pm 9,30$ vs $17,43\% \pm 9,03$, $p < 0,0001$ *** / p corrigé = $0,00055$), et surtout le genre *Prevotella 7* ($26,37\% \pm 8,62$ vs $13,10\% \pm 7,96$, $p < 0,0001$ *** / p corrigé = $0,00055$) (**Tableau 7 et Figure 26A**).

En comparant la composition du microbiote oral entre les genres, nous avons noté que la diversité du microbiote *alpha* chez les hommes nourris (selon l'indice de Chao) était significativement plus élevée que chez les femmes, ($2,58 \pm 0,14$ vs $2,30 \pm 0,19$, $p = 0,0036$ **) (**Tableau 8**).

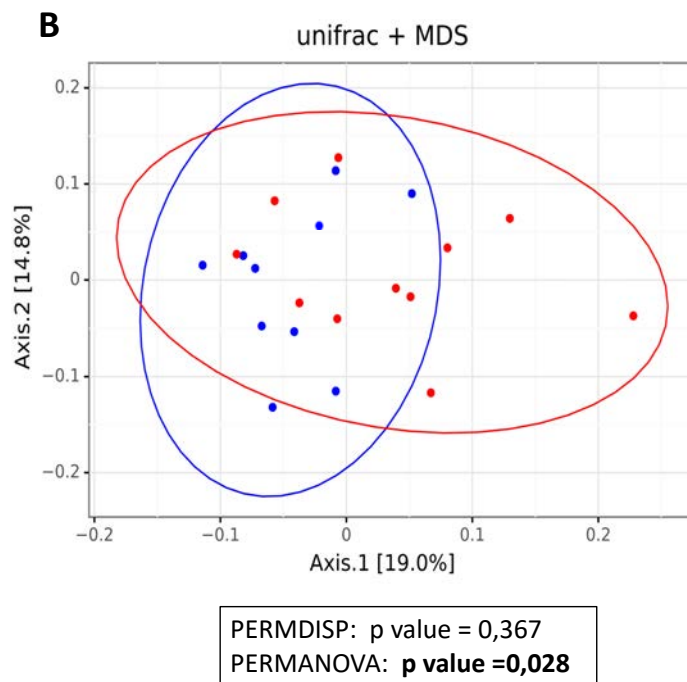
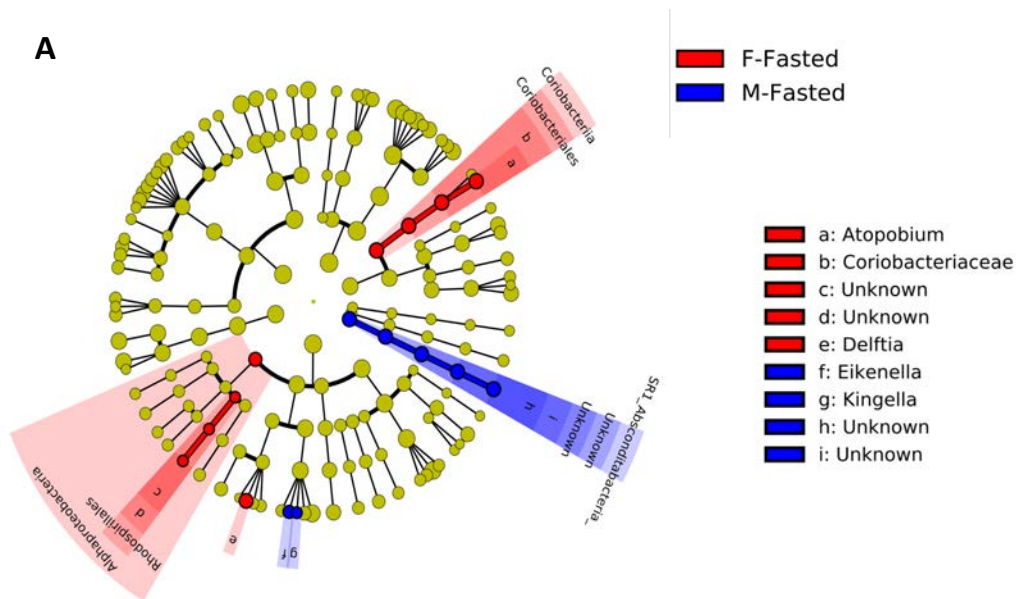


Figure 27: Comparaison de l'état du microbiote salivaire chez les hommes et les femmes quand ils sont à jeun.

A : Cladogramme linéaire basé sur l'analyse de la taille de l'effet d'analyse discriminante (LEfSe) pour le microbiote oral à partir de salive de femme à jeun par rapport à la salive d'homme à jeun pour l'analyse de la séquence 16S ADN de ces échantillons de salive. LDA score 2.0 pour cladogrammes

B : Représentation Unifrac de la diversité bêta entre la femme à jeun et l'homme à jeun. Un PERMDISP et un test PERMANOVA ont été effectués avec 999 permutations pour évaluer la différence entre les femmes et les hommes à jeun dans les analyses PCoA de diversité bêta.

La diversité *bêta* entre les deux genres dans les conditions à jeun ($p = 0,028$) et nourries ($p = 0,015$) était significativement différente (**Figures 27B et 28B respectivement**).

Nos résultats montrent également, en condition nourrie, une augmentation de l'abondance relative chez les femmes a été observée pour la grande famille des *Pasteurellaceae* ($12,925\% \pm 6,154$ vs $21,236\% \pm 10,220$, $p = 0,0465$ / p corrigé = $0,08$) et le genre *Haemophilus* ($12,271\% \pm 6,281$ vs $20,920\% \pm 9,998$, $p = 0,0371$ / p corrigé = $0,08$) (**Tableau 8 et Figure 28A**).

Le genre *Capnocytophaga* ($1,545\% \pm 1,557$ vs $0,628\% \pm 0,552$, $p = 0,0381$ / p corrigé = $0,05$) était significativement plus abondant chez les sujets masculins (**Tableau 8 et Figure 28A**).

À jeun, la principale différence entre les hommes et les femmes a été constatée pour le genre *Eikenella* ($0,084\% \pm 0,043$ vs $0,031\% \pm 0,053$, $p = 0,0074$ / p corrigé = $0,05$) qui est plus exprimé chez les sujets masculins (**Figure 27A**).

Dans le cladogramme comparant les hommes et les femmes à jeun et nourris (**Figures 27 A et 28 A**), nous avons identifié des bactéries qui sont des signatures à la fois du sexe masculin et des conditions nourries : les *lentimicrobiacées* et *Capnocytophaga* (appartenant au *phylum des Bacteroidètes*) étaient surreprésentés dans les échantillons salivaires mâles et pourraient ainsi faire partie d'une signature du microbiote masculin.

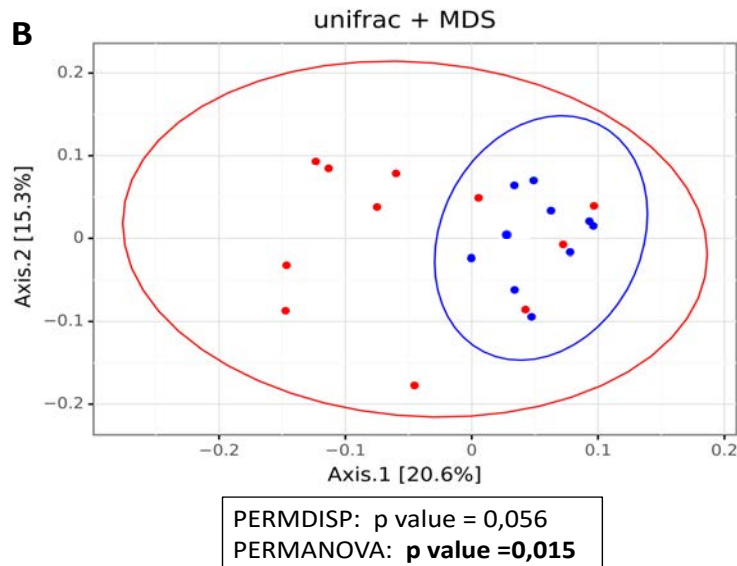
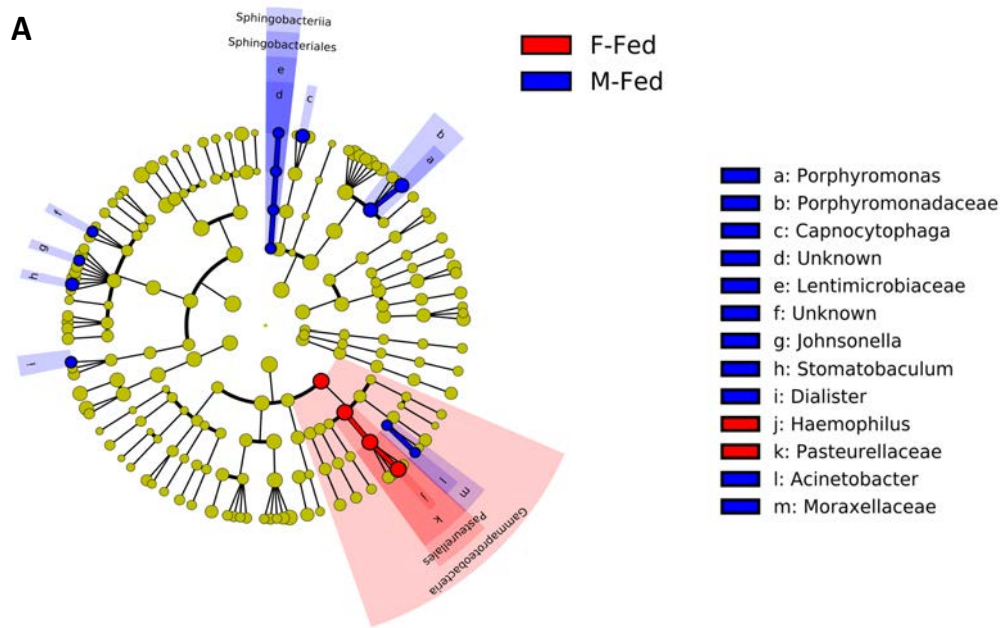


Figure 28: Comparaison de l'état du microbiote salivaire chez les femmes et les hommes quand ils sont nourris.

A : Cladogramme linéaire basé sur l'analyse de taille d'effet d'analyse discriminant (LEfSe) pour le microbiote salivaire des femmes nourries comparé au microbiote salivaire des hommes nourris pour l'analyse de séquence de l'ADN 16S dans ces échantillons de salive. LDA note 2.0 pour cladogrammes.

B : Représentation Unifrac de la diversité bêta entre les femmes nourries et les hommes nourris. Un PERMDISP et un test PERMANOVA ont été effectués avec 999 permutations pour évaluer la différence entre les femelles nourries et les mâles nourris dans les analyses de la bêta-diversité PCoA

De la même manière, le genre *Haemophilus* de la famille des *Pasteurellaceae* était surreprésenté dans les échantillons salivaires des femmes après alimentation et pourrait être une signature du microbiote salivaire féminin.

Notre étude suggère que les hommes ont un microbiote oral distinct par rapport aux femmes nourries ou à jeun, ce qui pourrait être lié à la réponse glycémique après la prise alimentaire. Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre le rapport glycémie nourrie / glycémie à jeun (changement du niveau glycémique) et le microbiote oral (**Suppl. Figure 3**), mais une corrélation significative et positive a été trouvée entre le niveau de changement glycémique et le niveau de changement de l'activité lipase dans la salive (**Suppl. Figure 4 et Figure 29**).

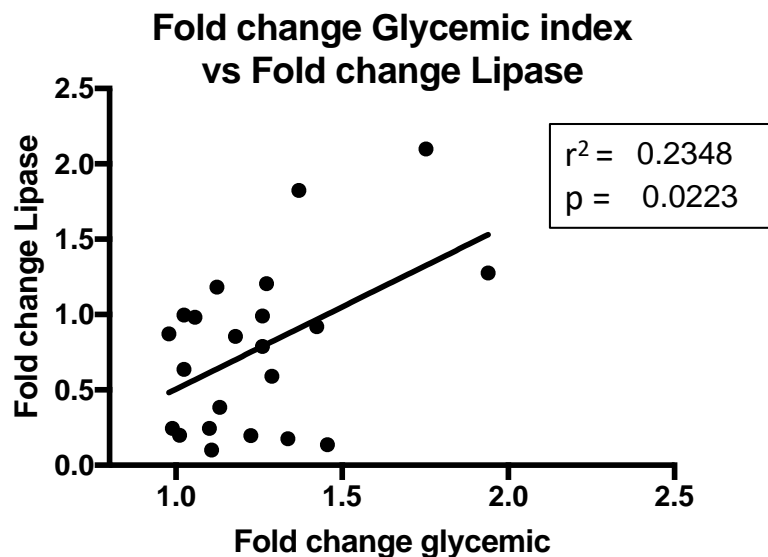


Figure 29 : Corrélation positive entre le changement glycémique et le changement de l'activité lipase dans la salive

Ainsi, nous nous proposons d'effectuer une étude plus approfondie des bactéries orales spécifiques pour surveiller la réponse glycémique.

4.2.4 DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons montré que dans une cohorte d'hommes et de femmes liés par l'âge et l'éducation, des différences significatives de certains métabolites, enzymes et espèces bactériennes avaient été observées avant et après une alimentation.

Jusqu'à présent, peu d'articles ont été publiés sur les activités métaboliques et enzymatiques de la salive. Cependant, il a été montré que ces paramètres peuvent être influencés par de multiples facteurs comme par exemple, une grande disparité dans les taux de certaines enzymes, due au simple fait de fumer (174). Ici, nous montrons des différences de taux de cholestérol salivaire et de triglycérides entre les hommes et les femmes à jeun mais pas à l'état nourri, comme décrit précédemment (175).

De plus, nous avons observé des différences majeures des taux de cholestérol et de lipase salivaire après l'alimentation avec une réduction de plus de deux fois de la lipase après une prise alimentaire. Bien que certains auteurs (176) (157) (177) aient mis en évidence une lipase de la langue de rat hydrolysant les triglycérides en di glycérides et acides gras libres avec un pH optimal de 4,5 à 5,4. Cette lipase linguale ou LIPF n'est pas exprimée au niveau de la langue humaine (178). Ainsi, d'autres lipases pourraient être responsables de cette activité. On sait que l'activité des différentes lipoprotéines lipases (LPL) est régulée par l'insuline. Par exemple, dans le tissu adipeux, la concentration de LPL est plus élevée après la prise de nourriture (179).

Cependant, dans le muscle squelettique et le cœur, la concentration de lipoprotéine lipase est diminuée dans ces conditions. Nous montrons ici que dans la salive, une diminution des concentrations de lipase est détectée après l'alimentation. Nous montrons également une corrélation linéaire entre le niveau de changement glycémique et le niveau de changement de l'activité lipase signifiant que la concentration de lipase et la glycémie pourraient être liées.

La signification des taux de lipase salivaire que nous avons montrés ici n'est pas encore claire, mais, comme mentionné précédemment, elle pourrait être impliquée dans la sensibilité au goût des graisses (180) et donc dans la régulation de l'appétit.

Nous avons également trouvé des différences dans les taux de triglycérides et de cholestérol uniquement à jeun entre les hommes et les femmes. Il a été démontré que les triglycérides salivaires sont corrélées aux niveaux des caries dentaires (181).

De la même manière que les caries sont liées à des espèces bactériennes spécifiques, nous avons observé des changements dans le microbiote des hommes et des femmes, *Streptococcus* étant davantage représenté chez les hommes et *Haemophilus* chez les femmes.

Des différences spécifiques liées aux sexes ont également été rapportées dans le microbiote salivaire des enfants présentant des caries (182) et il serait intéressant d'étudier l'origine et de trouver une utilité thérapeutique potentielle de ces différences.

Une relation a été précédemment observée entre le microbiote intestinal et l'état nutritionnel (183). Les *Firmicutes* et l'entérotipe *Prevotellaceae* étaient plus abondants dans les régimes riches en glucides ou en sucres simples (glucose et fructose) alors que les *Bacteroidetes* étaient plus présents dans les régimes riches en protéines animales.

Nous avons montré ici des corrélations similaires pour le microbiote oral. Le microbiote oral et intestinal sont liés par un flux constant de salive ingérée et ce lien avait été démontré dans de nombreuses maladies digestives systémiques (184), suggérant l'importance du microbiote buccal dans la santé locale et systémique.

Les *Bacteroidetes* étant également plus fréquents dans le microbiote intestinal des personnes obèses et chez ceux qui suivent un régime riche en graisses (85) (185), les relations possibles entre le microbiote oral et les pathologies liées à l'obésité peuvent être intéressantes pour le diagnostic et les stratégies thérapeutiques, comme déjà décrit pour le microbiote intestinal (186) (129) (187) (188).

Les microbiotes sont des indicateurs de l'état physiologique d'un tissu ou d'un organe. Si chaque individu et chaque organe ont un profil microbien distinct, il est intéressant d'observer des changements dans ces microbiotes qui pourraient être caractéristiques d'états pathologiques. Le microbiote salivaire a été caractérisé par J Max Goodson et al. qui trouve principalement des bactéries anaérobies (58).

Dans nos études, des variations de plusieurs types de bactéries ont été observées après les prises alimentaires. En particulier, on constate une diminution de la proportion du *phylum Bacteroidetes* et une augmentation du *phylum Firmicutes*.

Dans la littérature, les *phylums Bacteroidetes* et *Firmicutes* ont été principalement étudiés dans le microbiote intestinal. Le *phylum Bacteroidetes* est absolument nécessaire pour la digestion des matériaux fibreux (189). Il aide également à la digestion des polysaccharides complexes dans l'intestin. La plupart de ces bactéries sont anaérobies et la flore intestinale change avec la modification de l'alimentation. Les *Bacteroidetes* sont sous-représentés dans la flore intestinale des souris et des humains obèses, prédisposés à souffrir de diabète de type 2 (58), mais on ne sait pas encore si les *Bacteroidetes* jouent un rôle bénéfique ou néfaste dans ce type de pathologie.

L'autre *phylum* dont nous avons montré qu'il était modifié dans le microbiote buccal après une alimentation est le *phylum Firmicutes*, contenant des bactéries à Gram positif. Ley et al (99) ont étudié le microbiote intestinal et nous avons trouvé des résultats similaires aux leurs sur le microbiote oral.

Dans les deux cas, le niveau de *Firmicutes* est beaucoup plus élevé après l'alimentation et peut donc être impliqué dans l'obésité et les pathologies liées à l'obésité. Ces observations peuvent paraître surprenantes car de nombreuses bactéries présentes dans la cavité buccale dépendent du glucose pour leur croissance. L'hypothèse proposée par Goodson et al (58) est que l'hyperglycémie perturbe le niveau d'acidification et que ces changements sont bénéfiques pour les *Firmicutes* et néfastes pour les *Bacteroidetes*.

Une information importante extraite de notre étude et de la littérature (190) est que le microbiote oral est moins diversifié à jeun que nourri, mais cet état n'est pas seulement dû à une prise alimentaire.

En fait, la diversité bactérienne de la salive peut être modifiée par un certain nombre de facteurs tels que les changements de pH, dont il a été démontré qu'ils modifient d'autres microbiotes. Ces modifications du microbiote oral montrent dans notre étude une augmentation des streptocoques qui pourrait être liée à des modifications du métabolisme des sucres (191). En fait, les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* ont une capacité remarquable à métaboliser les glucides par fermentation, générant ainsi des acides comme

sous-produits (192). L'acidification excessive de l'environnement buccal par des espèces aciduriques telles que *Streptococcus mutans* est directement associée au développement de caries dentaires (192). Cette variabilité est similaire à celle observée dans le microbiote intestinal.

Enfin, des différences ont pu être observées dans le microbiote salivaire entre les hommes et les femmes à jeun mais encore plus en condition nourrie, où *Porphyromonas* et *Capnocytophaga* étaient surreprésentés dans les échantillons salivaires mâles par rapport à la salive féminine comme le suggère la littérature (193). Une des caractéristiques des bactéries *Capnocytophaga* est leur métabolisme strictement fermentatif, dépendant de la présence de CO₂, de la présence de composants réactifs à la benzidine et de la production des acides acétique et succinique (194).

Un autre facteur important impliqué dans ces différences entre les genres pourrait être lié à l'effet des hormones sexuelles (195) (196). En fait, des études récentes indiquent que l'effet protecteur de l'estradiol vis-à-vis d'infection, dépend du sous-type de récepteur des œstrogènes et du compartiment tissulaire spécifique impliqué dans l'agression bactérienne, ce qui suggère que l'expression tissulaire spécifique de récepteurs de stéroïdes sexuels particuliers contribue à la susceptibilité aux infections bactériennes. De plus, ce biais dépend également des effets des hormones sexuelles sur des espèces bactériennes spécifiques (196).

Donc, pour conclure, lors de l'alimentation, il y a une baisse de la pression de CO₂ dans la cavité buccale entraînant une augmentation des streptocoques et donc une augmentation de l'acidité buccale ainsi qu'une diminution des *Prevotellaceae*. Ainsi, bien que certains de ces changements dans le microbiote puissent être directement dus aux différents degrés de glycémie, un certain nombre d'autres facteurs, tels que le pH, les changements hormonaux ou d'autres changements métaboliques, peuvent également influencer les changements observés dans le microbiote. Indépendamment de l'explication de ces résultats, ils renforcent l'idée que les changements des biomarqueurs métaboliques et microbiologiques dans la salive pourraient être des indicateurs utiles de l'état systémique (197).

En résumé, nous avons mené une courte étude pilote montrant qu'à l'état à jeun, les taux de cholestérol, de triglycérides et d'acides gras libres dans la salive sont différents entre les

sujets masculins et féminins. Ces paramètres biologiques varient également significativement avec le degré de glycémie (à jeun vs nourri), tout comme les niveaux de certaines espèces bactériennes. Cette étude confirme l'intérêt croissant pour la salive en tant que fluide biologique pour explorer les différences entre les hommes et les femmes qui, selon nous, pourraient être importantes pour les futurs traitements de la « médecine personnalisée ».

4.3 RESULTATS EXPERIMENTAUX (III)

LE ROLE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE TH17 DANS L'AGGRAVATION DE L'INSULINO-RESISTANCE INDUITE PAR UNE LESION PERI-APICALE CAUSEE PAR *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) ET PAR SON LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS).

MINTY MATTHIEU

Laboratoire : Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (INSERM UMR 1048) /
Équipe 2

Encadrants : Vincent Blasco-Baque, Anaïs Briot

Équipe : Rémy Burcelin

4.3.1 INTRODUCTION

Le diabète de type 2 (DT2) est actuellement considéré par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la première maladie pandémique non infectieuse de l'humanité (198). La charge de morbidité liée au diabète est élevée et en augmentation dans tous les pays, alimentée par la hausse mondiale de la prévalence de l'obésité et de nombreux facteurs de risques tels que les mauvaises habitudes alimentaires, l'excès de poids, le mode de vie sédentaire ou encore le stress.

Le DT2 se caractérise par un défaut partiel ou complet de l'action de l'insuline définie par la résistance à l'insuline. L'hyperglycémie caractérisant cette maladie métabolique est expliquée par une association en combinaison variable d'un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules bêta des îlots de Langerhans et de l'action de l'insuline appelé insulino-résistance (IR). L'origine de la résistance à l'insuline reste imparfaitement définie sur le plan étiologique, mais de nombreuses études chez l'homme et la souris montrent une association avec une réaction inflammatoire chronique et permissive dite «de bas grade » (87). En effet, les patients diabétiques présentent une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, qui altèrent la voie de signalisation de l'insuline, favorisant ainsi l'apparition et/ou l'entretien de l'insulino-résistance du DT2. Ce dernier mécanisme peut trouver son origine dans la présence de lipopolysaccharides (LPS) (composant de la surface des bactéries Gram-négatif) dans le sang des diabétiques. Les bactéries Gram-négatif et leurs métafacteurs comme le LPS, peuvent migrer dans le sang depuis l'intestin, et ce phénomène est appelé « Endotoxémie Métabolique » (199) à l'origine d'une inflammation chronique de bas grade.

Des résultats de notre laboratoire ont montré que la cavité buccale était une autre source de bactéries Gram négatif (200) lors des dysbioses du microbiote oral associées aux pathologies buccales comme les maladies péri-apicales.

La Maladie péri-apicale est une infection bactérienne du péri-apex de la dent avec une réaction immuno-inflammatoire de l'ensemble des tissus de soutien de la dent (os et desmodonte) au niveau de l'apex (partie apicale de la racine de la dent contenu dans l'os). Selon les études épidémiologiques, la prévalence des maladies péri-apicales (lésions péri-apicales, LPA) varie de 20% à 50% dans la population générale alors qu'elle est de 60% chez

les patients diabétiques (201). Ces résultats ont mis en évidence la relation bidirectionnelle entre les LPA et le diabète (202) (203) (204). Les individus diabétiques sont fréquemment atteints de maladies péri-apicales plus sévères que dans la population générale.

De plus, les patients atteints de maladies péri-apicales avec présence de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) (205) augmentent leur risque de développer un diabète de 27-53% (206). La présence et la quantité de *Pg* au sein de la bouche sont positivement corrélées avec la sévérité de l'insulino-résistance des souris diabétiques. Son nombre est fortement augmenté dans les maladies péri-apicales (200) (129). Cette espèce bactérienne à Gram négatif et contenant le LPS (défini comme un antigène) provoque une réaction immunitaire au sein de la cavité buccale. Cette réaction favorise une inflammation locale et augmente la perméabilité de la barrière épithéliale au niveau buccal (207) favorisant la translocation de *Pg* et de ses LPS vers le compartiment sanguin et vers d'autres tissus métaboliques cibles (208). Les LPS de *Pg* activent les cellules immunitaires inflammatoires stimulant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL1, TNF alpha, IL6...) et notamment d'interleukine 17.

Cette cytokine est caractéristique des cellules TH17, ayant donné son nom à ces cellules, et existe sous six formes, nommées IL-17 A-F. La forme A est de loin la plus étudiée. L'IL-17 est connue pour son action pro inflammatoire dans les pathologies auto-immunes, mais il est maintenant clair que son rôle est plus nuancé (209). Il existe des interactions de l'IL-17 avec le microbiote et inversement des actions du microbiote sur la production de l'IL-17. Dans les modèles animaux de diabète, la pathogénicité du microbiote est augmentée par le diabète, et cette augmentation peut être largement inversée par l'inhibition de l'IL-17 (111) (210).

La réaction immunitaire à profil TH17 a pour but la protection vis à vis des infections bactériennes et fongiques (211) ainsi que leur dissémination. Cependant des réponses TH17 surdimensionnées sont également associées à un grand nombre de pathologies, comme de nombreux cancers oraux faciaux et pathologies auto-immunes (212). Dans la cavité buccale, une réduction du nombre de bactéries Gram négatif est concomitante avec une diminution dans la fonctionnalité de la réaction TH17 au niveau local et systémique (213). La différenciation et l'expansion des cellules TH17 sont contrôlées par certaines bactéries anaérobies productrices de LPS comme *Pg* (214). Un traitement antibiotique ciblant les

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) résidents diminue de façon significative la fréquence de cellules TH17 (213).

Il existe donc un lien entre *Porphyromonas gingivalis*, ses LPS et la voie Th17 / IL-17 au niveau buccal (215) pouvant contribuer à l'insulino-résistance au cours du diabète.

L'objectif de ce travail est d'évaluer le rôle de la réponse immunitaire à profil Th 17 dans les effets délétères des lésions péri-apicales induites par *Pg* sur les désordres métaboliques au cours de la progression du diabète de type 2. Pour cela nous avons utilisé un modèle unique de maladie péri-apicale en infectant, chez la souris, la cavité endodontique et stérile de la dent avec différentes solutions contenant : une souche de *Pg* sauvage de référence ou une souche mutée de *Pg* dont le LPS est dépourvu de sa partie O-saccharidique (**Figure 30**). Ce modèle présente l'avantage d'évaluer la réponse immunitaire spécifique vis à vis d'une bactérie dans un organisme immuno-compétent par rapport à des travaux sur souris axéniques. Après induction de la maladie péri-apicale, nous avons comparé des souris génétiquement modifiées IL17 KO et des souris sauvages (WT) soumises à un régime gras afin d'induire un diabète de type 2. Nous avons par la suite effectué des analyses phénotypiques dentaires, métaboliques, inflammatoires et du microbiote pour mieux caractériser l'importance de la voie immunitaire Th17 dans le développement du diabète de type 2.

4.3.2 MATRIELS ET METHODES

4.3.2.1 ANIMAUX

Des souris femelles C57Bl/6J, WT et IL17 KO, âgées de 8 semaines et groupées par cage de 6, ont été élevées dans un environnement contrôlé sans-pathogène (à 22°C, cycle inversé jour/nuit de 12h avec extinction de la lumière à 10h) avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les souris âgées de 8 semaines sont opérées sous anesthésie générale (solution de kétamine, xylazine en Intra Péritonéale (IP) 75-100 mg/kg + 10 mg/ kg) .

A l'aide de matériel de chirurgie dentaire, un orifice est percé dans les premières molaires mandibulaires (droite et gauche) afin d'accéder à la cavité endodontique close et stérile. Nous déposons dans cette cavité 1µL de solution de notre choix contenu dans de la carboxy-

methylcellulose. Ainsi, selon la solution déposée, les souris ont été randomisées en 3 groupes dans chacune des 2 catégories de souris (WT et IL17KO) : 1 groupe n'a pas subi de colonisation et les 2 autres groupes ont subi une colonisation avec soit une souche de *Pg* sauvage (WT) (ATCC 33 277) ou une souche de *Pg* mutée dont le LPS est dépourvu de sa partie O-saccharide (WZY : Em PGN_1242). Soit un total de 6 groupes de 6 souris.

La souche dépourvue de LPS a été construite de la manière suivante : une cassette conférant une résistance à la Clindamycine (antibiotique de la famille des lincosamides utilisé dans le traitement de certaines infections graves des dents ou des tissus mous) a été insérée dans un plasmide au niveau de la région PG1242 codant pour la O-polymérase *wzy*, puis ce plasmide a été transfecté par électroporation dans la souche sauvage de *Pg*. WZY n'est donc plus exprimée et ne permet plus la polymérisation de la partie O-polysaccharidique de l'antigène O formant la partie antigénique du LPS (**Figure 30**).

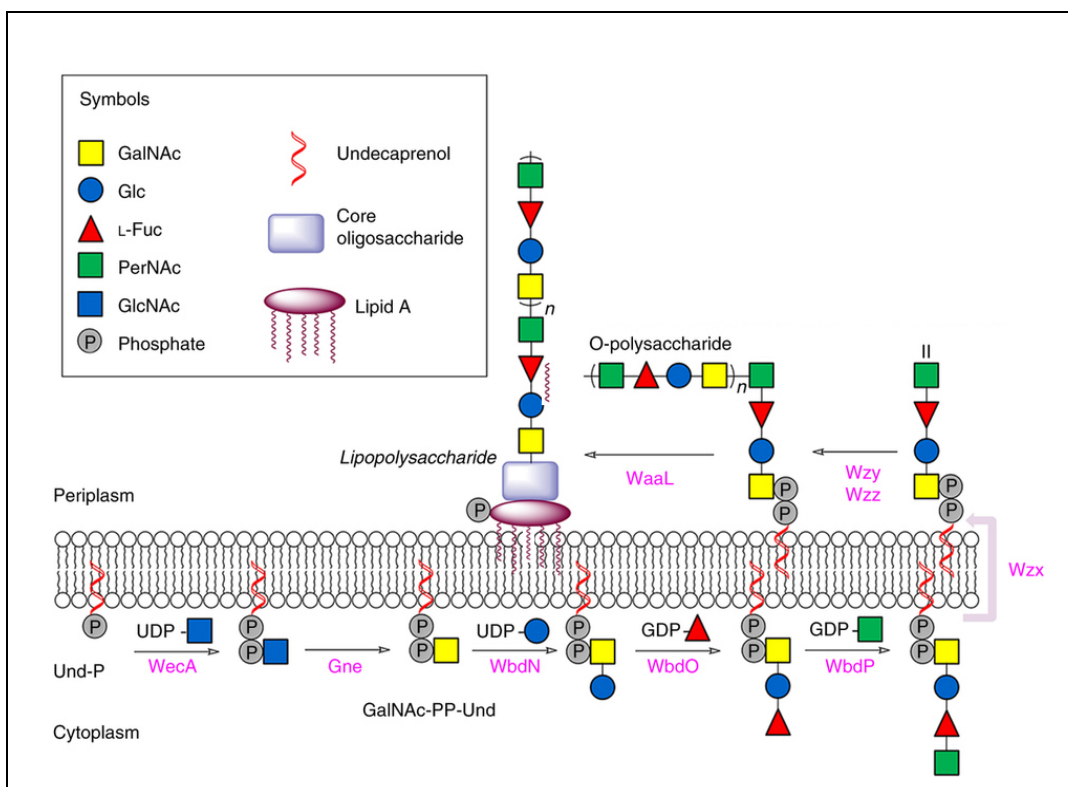


Figure 30: Schéma du mécanisme de délétion de la partie O-polysaccharide (antigène-O) du LPS de *Pg*.

La O-antigène-polymérase *wzy* n'est plus exprimée et ne permet plus la polymérisation de l'antigène O. Le LPS de *Pg* possèdera alors une seule répétition de l'unité composant l'antigène O.

La cavité est ensuite obturée hermétiquement à l'aide d'un ciment endodontique classique. Un mois après, les souris contrôles (Sham), les groupes colonisés avec la souche de *Pg* sauvage (*Pg* WT) ou la souche dépourvue en LPS (NoLPS *Pg*) ont été mises sous régime HFD (High Fat Diet) pendant 2 mois (**Figure 31**).

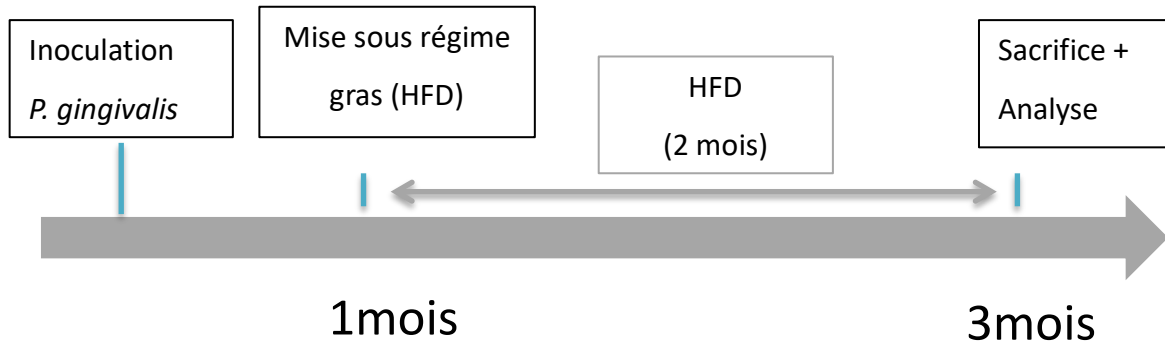


Figure 31: Chronologie des expérimentations animales

Toutes les procédures expérimentales animales ont été approuvées par le comité local éthique de l'Hôpital Universitaire de Rangueil (Toulouse) et de l'INSERM.

4.3.2.2 REGIME

Les souris sont soumises à un régime gras particulier et propre à l'équipe, « High Fat Diet 72% » (HFD 72%) et ce pendant 2 mois. Les caractéristiques de ce régime sont : 72% de lipides, <1% de carbohydrates et 28% de protéines en équivalent calorique.

Ce régime hyper-lipidique a la particularité d'être non obésogène et a pour intérêt de rendre les souris diabétiques.

4.3.2.3 VALIDATION DU MODELE

4.3.2.3.1 Analyses radiographiques

Les mandibules gauches ont été prélevées le jour du sacrifice et stockées à 4°C jusqu'à l'analyse radiographique. Ces analyses ont été effectuées par microtomographie radiographique (Phoenix Nanotom microCT-nanoCT, Thermo Fisher) avec les paramètres suivants : tension de 70 kV, intensité de 100mA, avec 3000 images, un temps d'exposition de

500 ms et une taille de Voxel de 3µm. Ensuite des images 3D ont été reconstruites après traitement informatique et numérisation. (Coll. Beatrice Thivichon-Prince, ENS de Lyon).

4.3.2.3.2 Analyses histologiques

Les mandibules droites ont été prélevées le jour du sacrifice et fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 24h/48h puis mises sous éthanol à 70%. Les mandibules ont été décalcifiées avec le système de décalcification de fixation Sakura TDE™ (Le système décalcifiant SAKURA TDE™30 repose sur un principe électrolytique simple qui, en combinaison avec la Solution TDE™30, permet de décalcifier les os. Après décalcification par le SAKURA TDE™30, les os peuvent être coupés plus facilement.). Des coupes de 5µm ont été réalisées et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les lames sont ensuite observées au microscope optique.

4.3.2.4 ANALYSES DES PARAMETRES METABOLIQUES

4.3.2.4.1 Test de tolérance au glucose en intra-péritonéal

Après un jeûne de 6h, une solution de glucose à 20% est injectée par voie intra-péritonéale (1mg/g de poids de souris). La glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre (Roche Diagnostics, Meylan, France) sur une goutte de sang prise à la queue, aux temps T = -30 min avant injection de glucose, T = 0, T = 30, T = 60 et T = 90 min (après injection).

4.3.2.4.2 Mesure pondérale

Le poids a été pris chaque semaine durant les 3 mois (1 mois d'inoculation + 2 mois de régime gras) (*Figure 33A*).

4.3.2.5 ANALYSES DE L'INFLAMMATION

4.3.2.5.1 Numération de la formule sanguine (NFS)

La Numération de la Formule Sanguine (NFS) est obtenue avec l'Appareil d'hématologie, (Modèle ABX Micros 60 de chez Horiba Medical™) à partir de 30 µL de sang prélevé au niveau du sinus rétro-orbitaire avec une pipette pasteur préalablement héparinée (100 U1/mL).

4.3.2.5.2 Cytométrie en flux

Toutes les opérations sont effectuées à +4°C. La rate et les ganglions cervicaux sont prélevés puis écrasés dans le milieu Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 additionné de 10% de Sérum de Veau Foetal afin d'obtenir une suspension cellulaire. Les globules rouges sont lysés dans la suspension de rate grâce notamment à une solution hypertonique (ACK : Ammonium Chlorure Potassium). Les suspensions cellulaires sont centrifugées (1500 rpm pendant 10 min) et les cellules reprises dans du milieu RPMI 1640.

Afin d'éviter les marquages non spécifiques et de bloquer les récepteurs Fc (Fragment cristallisable de la région Fc) des immunoglobulines sur les leucocytes, les cellules sont incubées dans un tampon de blocage (contenant du sérum de rat décomplémenté, du sérum de souris décomplémenté et un anticorps anti-CD16/CD32 (BD)) pendant 20 min, puis incubée 30 min avec les anticorps spécifiques anti-MHCII (V450) au 1/600 (eBioscience), anti-CD45 (BV510) au 1/100 (BD), anti-TCR (PeCy7) au 1/400 (BD), anti-CD4 (APC-Cy7) au 1/400 (eBioscience), anti-CD3 (FITC) au 1/100 (BD), et anti-CD19 (PerCpCy5.5) au 1/200 (BD). Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées (tampon eBioscience) pendant 60 min à +4°C puis marquées avec les anticorps anti-ROR γ t (APC) au 1/200 (eBioscience) et anti-Foxp3 (PE) au 1/200 (eBioscience). Parallèlement, des isotypes contrôles ont été utilisés pour identifier le marquage non spécifique. Les cellules marquées sont ensuite analysées par Cytométrie en flux (LSR Fortessa, Becton Dickinson) et les données sont analysées à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star Inc).

Afin de quantifier la production de cytokines par les lymphocytes T CD4, les suspensions cellulaires sont stimulées pendant 4 heures à 37°C dans du Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) au 1/2000 (Sigma), de la Ionomycine au 1/2000 (Sigma) et de 2,5 μ g/ml Brefeldine A (Sigma). Les cellules sont marquées avec des anticorps de surface comme précédemment décrit. Puis elles sont fixées et perméabilisées pendant 1h à température ambiante et enfin marquées avec les anticorps anti-IL17 (FITC) au 1/200 (eBioscience) et anti-IL22 (PE) au 1/200 (eBioscience) pendant 60 min à +4°C.

4.3.2.6 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism V.5.00 pour Windows Vista (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes +/- l'écart standard à la moyenne (S.E.M).

Les différences statistiques ont été mesurées en utilisant des tests de Two way ANOVA suivi du Post-Hoc-Test de Bonferroni (216). Une valeur p (valeur de probabilité) inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

4.3.3 RESULTATS

4.3.3.1 FORMATION D'UNE LESION PERI-APICALE (LPA)

La formation d'une lésion péri-apicale (LPA) induite par *Pg* nécessite la présence d'un LPS complet et de l'interleukine 17 (IL 17).

Pour démontrer que le pouvoir pathogène de *Pg* est lié à un LPS complet et à l'IL17 dans le contexte du diabète de type 2, nous avons colonisé la cavité endodontique et stérile de la première molaire avec une souche de référence (*Pg* WT) ou une souche mutée pour le LPS (NoLPS *Pg*) chez des souris C57Bl6 WT et IL17KO.

Toutes les expériences ont été réalisées sous régime HFD pendant 2 mois.

- ✓ L'analyse radiographique en 3 dimensions (micro CT) montre que la colonisation endodontique par *Pg* WT induit une lyse osseuse péri-apicale après 3 mois signant le modèle de lésion péri-apicale (**Figure 32 A**).
- ✓ La colonisation par la souche mutée pour le LPS réduit la lyse osseuse et la zone de nécrose par comparaison à celle induite par la souche sauvage (**Figure 32 B**). Le LPS de *Pg* est donc un facteur prépondérant pour le développement des lésions péri-apicales.
- ✓ La colonisation par *Pg* WT chez les souris IL17KO réduit la lyse osseuse et la zone de nécrose par comparaison à celles induites chez les souris WT (**Figure 32 E**).
- ✓ La colonisation par No LPS *Pg* n'induit pas de différences supplémentaires chez les souris IL17 KO par rapport à la souche de *Pg* WT (**Figures 32 C et D**). L'interleukine 17 est nécessaire au développement des LPA lors d'une colonisation par *Pg*.

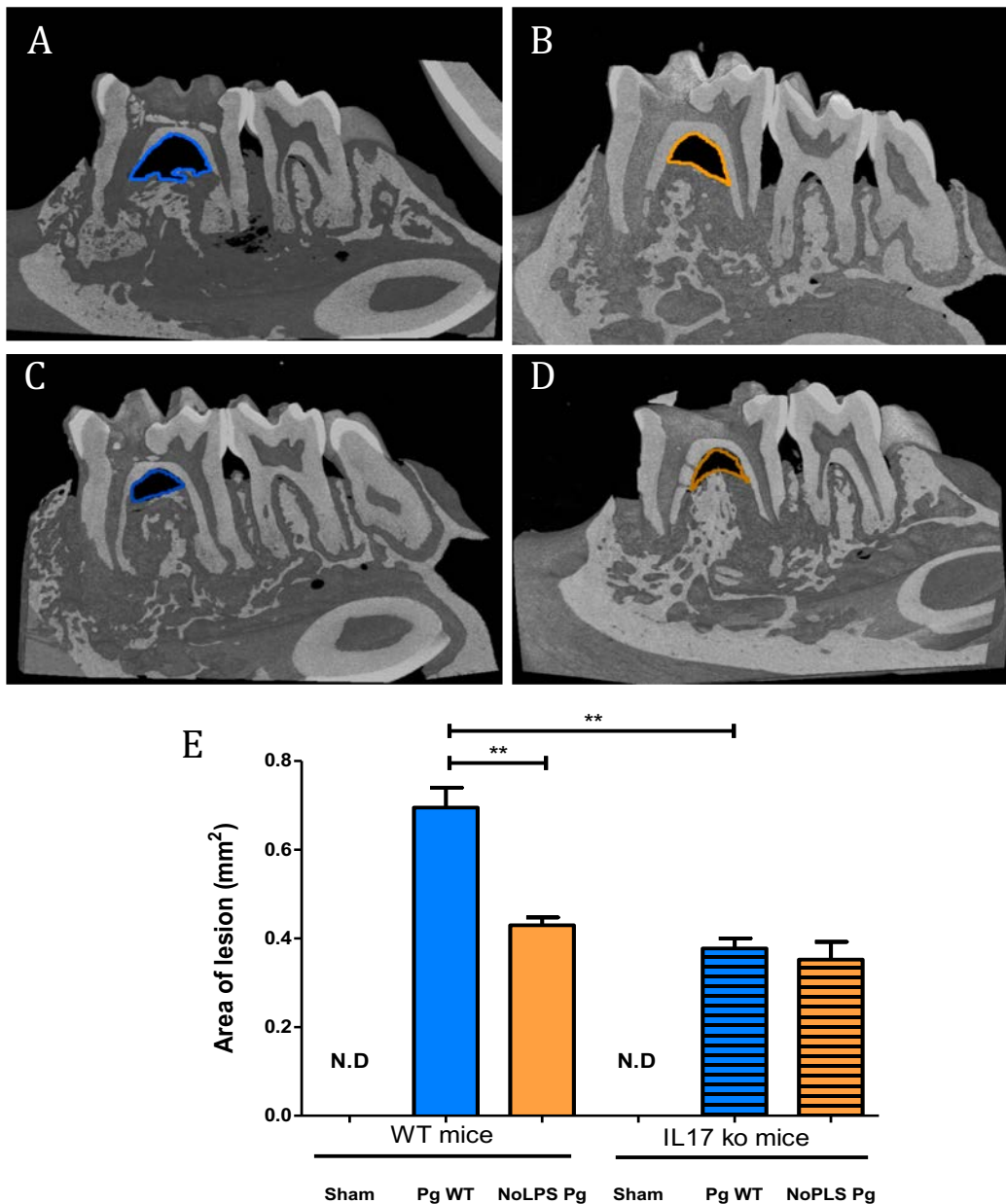


Figure 32: La lyse osseuse induite par *Porphyromonas gingivalis* (Pg) nécessite la présence d'un LPS complet et d'IL17. Un mois après la colonisation endodontique les souris ont été mises sous HFD pendant deux mois supplémentaires.

A, B, C et D : Analyses radiographiques (micro CT) d'une coupe sagittale passant par l'axe médian de la première molaire de souris :

- A. Souris WT (Sham), colonisées par la souche de Pg WT (blot bleu)**
- B. Souris WT (Sham) colonisées par la souche NoLPS Pg (blot orange)**
- C. Souris IL17 ko, colonisées par la souche de Pg WT (blot bleu barré)**
- D. Souris IL17 ko, colonisées par la souche NoLPS Pg (blot orange barré).**
- E. Analyse de l'aire de la lésion péri-apicale des différents groupes .**

4.3.3.2 EFFET SUR LE PLAN METABOLIQUE

Un LPS incomplet de *Pg* ou bien l'absence d'IL 17 préviennent l'altération de la tolérance au glucose induite par les lésions péri-apicales induite par *Pg*.

Afin d'étudier le rôle de l'IL17 et du LPS de *Pg* sur les paramètres du diabète de type 2 lors des lésions péri-apicales induites par *Pg*, un mois après la colonisation les souris ont reçu un régime Hyper Lipidique 72%.

- ✓ La colonisation avec *Pg* WT ou No LPS *Pg* n'influe pas sur le poids des souris au cours du temps quel que soit le fond génétique de ces souris (**Figure 33 A et D**).
- ✓ Après 2 mois de régime HFD, les souris WT colonisées avec *Pg* WT présentent une tolérance au glucose altérée par comparaison aux souris non colonisées sous HFD (Sham) (**Figure 33 B**).
- ✓ Les souris colonisées avec la souche mutée pour le LPS présentent une tolérance au glucose similaire aux souris non colonisées sous HFD (**Figure 33 C**).
- ✓ Les souris IL 17 KO colonisées avec *Pg* WT présentent une tolérance au glucose identique aux souris WT et IL17KO non colonisées (**Figures 33 C et E**).
- ✓ Les souris IL17 KO colonisées avec la souche mutée pour le LPS présentent une tolérance au glucose similaire aux souris IL17KO colonisées avec *Pg* WT. (**Figures 33 C et E**).

Ces observations suggèrent que l'interleukine 17 est nécessaire à l'altération de la tolérance au glucose sous HFD induite par la colonisation par *Pg* ainsi que celle induite par son LPS.

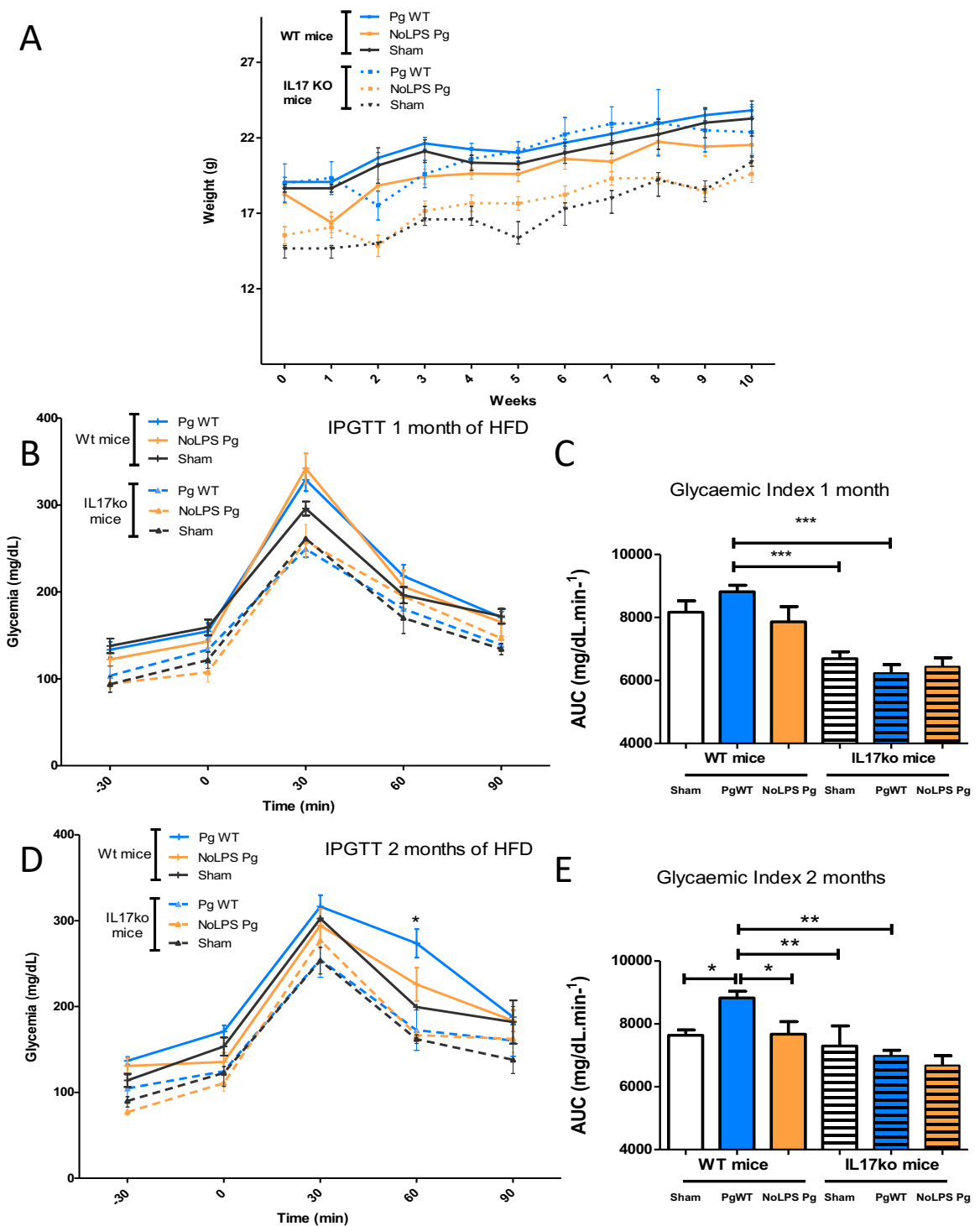


Figure 33: La lésion péri-apicale induite par Pg entraîne des désordres métaboliques passant par la voie immunitaire TH 17 sous HFD.

- A. Courbes de poids des différents groupes.**
- B. Test de tolérance au glucose en intra-péritonéal après un mois d'HFD.**
- C. Index glycémique après un mois d'HFD.**
- D. Test de tolérance au glucose en intra-péritonéal après deux mois d'HFD.**
- E. Index glycémique après deux mois d'HFD.**

4.3.3.3 EFFET SUR LE PLAN IMMUNO-INFLAMMATOIRE

L'absence d'IL17 et de LPS de *Pg* prévient les altérations immunitaires locales et systémiques induites par la colonisation endodontique par *Pg*.

Afin d'étudier les désordres immuno-inflammatoires induits par la colonisation endodontique par *Pg*, nous avons évalué la composition quantitative et qualitative des cellules immunitaires au niveau local dans les ganglions cervicaux et au niveau systémique dans la rate après 2 mois d'HFD.

- ✓ Dans les ganglions cervicaux des souris WT, la colonisation par *Pg* WT entraîne une augmentation du nombre de cellules immunitaires totales (CD45+) (**Figure 34 A**) et de lymphocytes à profil Th17 et une augmentation significative du nombre des lymphocytes CD19+ (lymphocytes B) (**Figure 34 B**). La colonisation par la souche mutée sur le LPS prévient l'augmentation des lymphocytes Th17 et de lymphocytes CD19+ induite par la colonisation endodontique par *Pg* (**Figure 34 B**).
- ✓ Dans la rate, la colonisation par *Pg* chez les souris WT induit une augmentation significative du nombre de cellules immunitaires CD45+ (**Figure 34 C**) et des lymphocytes à profil Th17 (**Figure 34 D**). La colonisation par la souche mutée sur le LPS prévient l'augmentation du nombre de cellules immunitaires (**Figure 34 C**), des lymphocytes Th17 et des CD19+ et CD8+ (**Figure 34 D**).

Afin d'étudier l'implication de l'IL17, nous avons évalué la composition quantitative et qualitative des cellules immunitaires au niveau local dans les ganglions cervicaux et au niveau systémique dans la rate à 2 mois d'HFD chez des souris IL17KO.

- ✓ Dans les ganglions cervicaux, l'absence d'IL17 prévient le recrutement des cellules immunitaires CD45+ (représentant les globules blancs totaux) quel que soit le type de colonisation (*Pg* WT ou NoLPS *Pg*) (**Figure 34 A**) associé à une diminution significative du nombre de CD19 (**Figure 34 B**), représentant les lymphocytes B.
- ✓ Dans la rate, en l'absence d'IL17 la colonisation par *Pg* n'induit pas d'augmentation du nombre de cellules immunitaires (CD45+) (**Figure 34 C**) ni du nombre de lymphocytes CD19 et CD8+ (**Figure 34 D**).

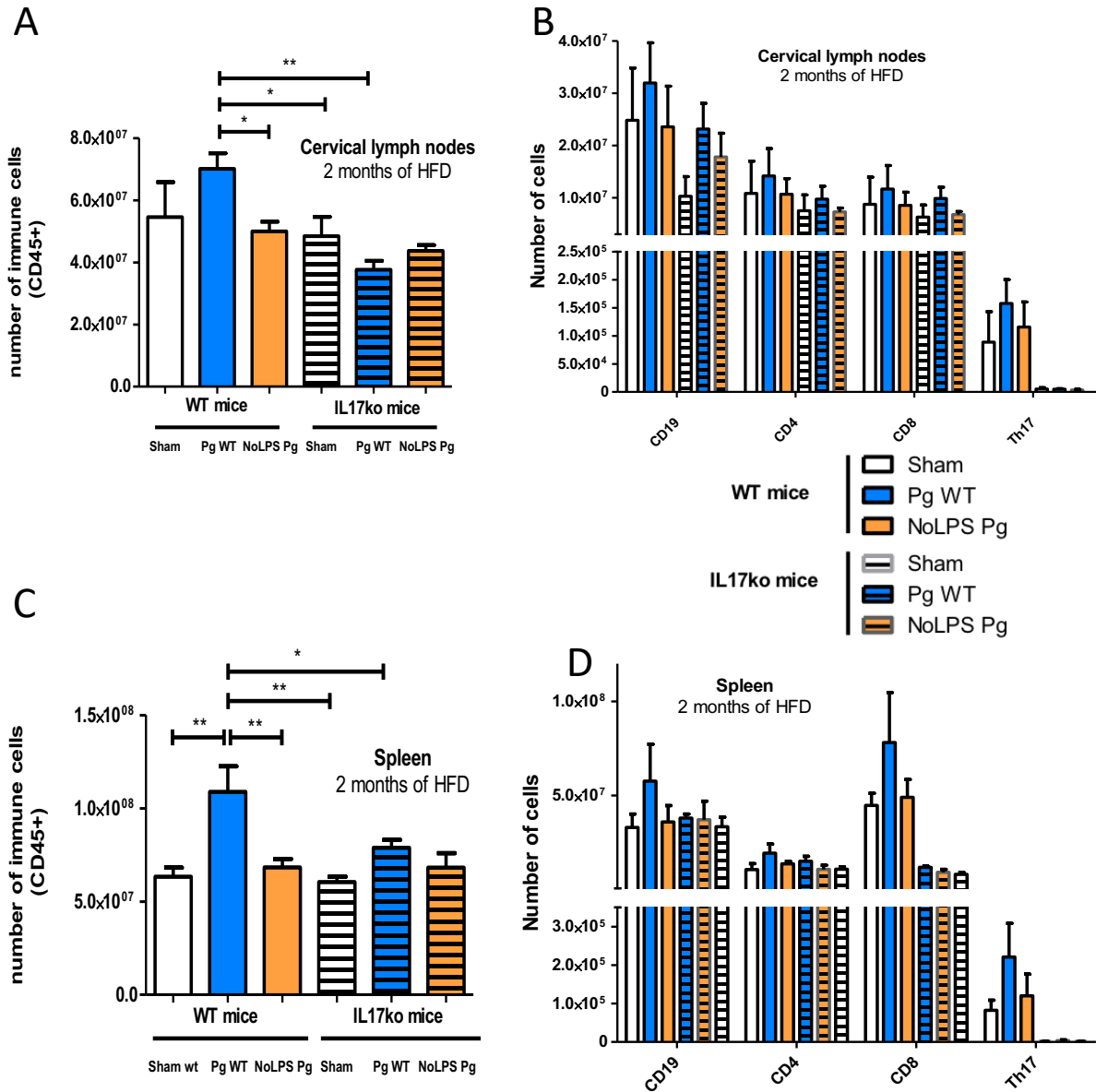


Figure 34: La lésion péri-apicale induite par Pg entraîne des désordres immuno-inflammatoires systémiques, aggravés par la présence de son LPS complet et d'IL 17.

A. Nombre de cellules immunitaires CD45+ dans les ganglions cervicaux après deux mois d'HFD.

B. Nombre de cellules dans les ganglions cervicaux après deux mois d'HFD.

C. Nombre de cellules immunitaires CD45+ dans la rate après deux mois d'HFD.

D. Nombre de cellules immunitaires dans la rate après deux mois d'HFD.

4.3.3.4 AUTRES ANALYSES ET CORRELATIONS

Le nombre total de cellules immunitaires est corrélé avec la gravité de la lésion péri-apicale et le pourcentage de cellules Th17 est corrélé avec l'altération de la tolérance au glucose.

Les interactions entre différents paramètres ont été étudiées par une analyse en régression linéaire.

Nous pouvons ainsi observer que:

- ✓ L'aire des lésions péri-apicales est corrélée positivement avec le nombre de cellules immunitaires CD45+ dans la rate (**Figure 35 A**) et avec le poids à deux mois de régime « High Fat Diet » (HFD) (**Figure 35 B**).
- ✓ Le pourcentage de lymphocytes Th17 dans la rate est corrélé positivement avec l'intolérance au glucose. (**Figure 35 C**)

.

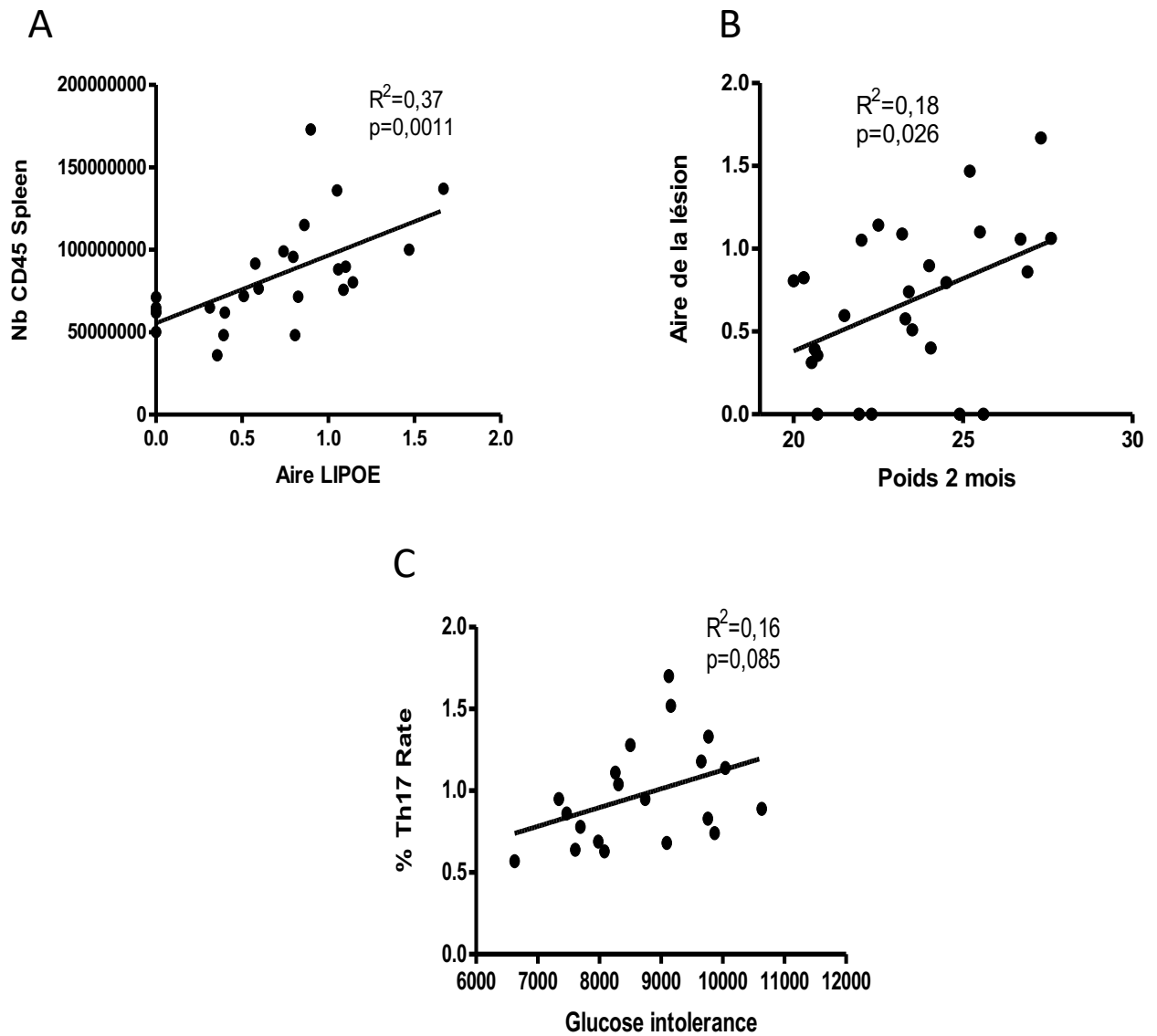


Figure 35: Corrélation linéaire des paramètres cliniques et des paramètres métaboliques.

- A. Entre l'aire des lésions péri-apicales et le nombre de cellules immunitaires CD45+ dans la rate.**
- B. Le poids à deux mois d'HFD et l'aire des lésions péri-apicales.**
- C. Le nombre de lymphocytes Th17 dans la rate et l'intolérance au glucose.**

4.3.4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

4.3.4.1 DISCUSSION

Récemment notre équipe a montré que *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) était un candidat clé dans la relation entre les maladies buccales et le diabète de type 2.

Pour déterminer le rôle des métafacteurs de *Pg* dans le développement de ces deux pathologies, nous avons mis au point un modèle unique de colonisation endodontique. Ce modèle présente l'avantage, par rapport à des travaux effectués des souris axéniques, d'étudier *in vivo* la réaction immunitaire spécifique à une bactérie donnée dans un organisme immuno-compétent.

Les résultats générés montrent que :

- ✓ Les maladies péri-apicales induites par *Pg* favorisent l'apparition des désordres métaboliques induits par le régime HFD.
- ✓ L'état diabétique des souris colonisées avec WT *Pg* est lié à une réaction immuno-inflammatoire à profil Th17.
- ✓ Les effets délétères locaux et systémiques de *Pg* sont dépendants d'une structure complète du LPS et de l'IL17.

Il est à noter que la souche mutée de *Pg* avec un LPS dépourvu de sa partie O-saccharidique est suffisante pour induire une lésion péri-apicale, bien que minorée par rapport au LPS complet (**Figure 32**). Ceci indique que d'autres métafacteurs sont aussi impliqués dans la pathogénicité de cette souche.

- ✓ *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) présente un arsenal spécifique de facteurs de virulence qui vont envahir le tissu péri-apical et se disséminer dans la circulation sanguine.
- ✓ *Pg* possède notamment des *fimbriae* qui permettent à la bactérie d'adhérer aux protéines salivaires ou à d'autres bactéries afin de permettre la formation d'un biofilm.
- ✓ *Porphyromonas gingivalis* trouve sa virulence dans sa capacité à se fixer, par liaison de ses *fimbriae* aux intégrines $\alpha 5\beta 1$ exprimées sur les cellules épithéliales, à l'endothélium vasculaire et aux différents épithéliums afin d'être transporté dans

l'organisme. Cela lui permet de traverser la barrière endothéliale et ainsi de rejoindre la circulation sanguine (217).

- ✓ Les *fimbriae* peuvent aussi stimuler les cellules hôtes (notamment les cellules de l'immunité innée) via leur fixation avec les récepteurs TLR2 et elles sont impliquées dans les réactions immuno-inflammatoires causées par la colonisation par *Pg*. Il a notamment été montré que l'augmentation de la glycémie chez les diabétiques était corrélée avec la présence de clones de *Pg* avec *fimbriae* de Type II (218).
- ✓ D'autres méfacteurs virulents incluent des protéases à cystéine, comme les Arg-gingipains ou Lys-gingipains spécifiques des liaisons Arg-X et Lys-X peptide, qui sont capables de dégrader un certain nombre de protéines de l'hôte.

Ainsi, ces observations montrent le rôle complémentaire d'autres méfacteurs comme les *fimbriae* dans les effets systémiques délétères induits par *Pg*.

Nos conclusions confirment les résultats de la littérature sur le rôle du LPS de *Pg* dans les désordres métaboliques induits par *Porphyromonas gingivalis*.

- ✓ Les Lipopolysaccharides (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) avaient déjà été démontré comme un facteur aggravant des désordres métaboliques et de l'insulino-résistance induit par un régime gras (129).
- ✓ Le LPS de *Pg* est capable de stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (219) et sont connus pour induire l'adipogenèse (220).
- ✓ Le LPS de *Pg* pourrait ainsi être impliqué dans le développement d'une réponse compensatoire des cellules β participant à l'insulino-résistance chez des individus pré-diabétiques avec une infection bucco-dentaire.

Les lésions péri-apicales sont une source continue de LPS (221) qui est reconnue par le système immunitaire, notamment par l'intermédiaire du récepteur TLR4 et des protéines accessoires CD14 et MD-2. L'activation du TLR4 va alors transmettre le signal de production de cytokines pro-inflammatoires par l'activation du facteur de transcription Nf- κ B (222).

Le LPS de *Pg* pourrait donc être responsable de l'activation chronique du système inflammatoire local et systémique, et donc être à l'origine ou responsable de l'aggravation de l'insulino-résistance induite par le régime HFD.

Nous observons que le profil immunitaire associé à la présence de *Pg* de ces souris est de type Th17, comme montré précédemment dans la lamina propria de l'intestin (223).

Les lymphocytes Th17 permettent notamment de lutter contre les bactéries extracellulaires, particulièrement celles qui colonisent la peau, les muqueuses de l'intestin et les voies aériennes (224). Ils participent à l'inflammation locale par le recrutement de polynucléaires neutrophiles et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL17, 21, 22). De ce fait, les lymphocytes Th17 sont impliqués dans les processus inflammatoires chroniques propices au développement des maladies systémiques. En effet cette réponse Th17 va avoir un impact sur la mise en place et le maintien de l'inflammation systémique dans des organes particuliers via des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires.

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) a notamment été identifié dans l'endocarde (endocardites) (225), les plaques d'athérome ou encore dans les hépatocytes (stéatose hépatique non alcoolique) (226) mettant en évidence le potentiel de dissémination de *Pg* dans l'organisme. La présence de *Pg* augmente le niveau inflammatoire via une réaction Th17 dans ces organes avec production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , IL1 β ou IL6 par les cellules immunitaires (227). Ces cytokines vont non seulement altérer la voie de signalisation à l'insuline mais elles vont également favoriser la différenciation de lymphocytes T naïfs en Th17. La présence d'IL-17 va également stimuler la production de facteurs chimio-attractants des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes eux-mêmes renforçant ainsi la présence du système immunitaire dans la zone infectée. Ce phénomène contribue à l'entretien et au maintien d'une réaction pro-inflammatoire propice aux désordres métaboliques et leurs complications. Ainsi, la mise en place d'une réponse immunitaire Th17 en réponse à *Pg* et au LPS de *Pg* dans la cavité buccale et dans l'organisme pourrait expliquer l'impact des maladies buccales sur le métabolisme glucidique.

En conclusion, notre travail ouvre de nombreuses perspectives pour comprendre à la fois l'implication des métafacteurs de *Porphyromonas gingivalis* autres que le LPS et à la fois le rôle de l'immunité Th17 dans les désordres métaboliques comme l'insulino-résistance.

4.3.4.2 PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude ouvrent des perspectives pour affiner la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels le LPS de *Pg* induit une réaction immunitaire de type Th17 favorisant le développement du diabète de type 2 (**Figure 36**).

Nos résultats montrent que même en l'absence de LPS complet de *Pg* on obtient une lyse osseuse péri-apicale (**Figure 32**). De ce fait, les facteurs de virulence de *Pg* ne sont pas uniquement liés à son LPS et nous nous posons la question de l'implication d'autres métafacteurs bactériens comme les *fimbriae*.

Dans ce but, nous envisageons de coloniser la cavité endodontique par une bactérie Gram positif ne possédant pas de LPS (**Figure 36 Outlook 1**) et en présence d'autres métafacteurs tel que *Lactobacillus reuteri*, couramment utilisé comme probiotique pour contrer la dysbiose buccale, et qui possède de nombreux effets bénéfiques sur l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance (228). Nous pourrions ainsi évaluer l'impact des autres métafacteurs bactériens impliqués et proposer la génération de souches mutantes de *Pg* pour les métafacteurs communs aux bactéries Gram positif et Gram négatif comme les *fimbriae* (*Pg sans fimbriae*) (**Figure 36 Outlook 1**)

Après avoir affiné la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels le LPS de *Pg* induit une réaction immunitaire de type Th17 favorisant le développement du DT2, il serait intéressant d'en trouver des applications cliniques.

En effet il faut savoir que la résolution d'une infection péri-apicale complète est compliquée, à cause de nombreux facteurs (229). De ce fait, de nouvelles stratégies de traitement curatif seraient envisageables. L'une d'entre elles pourrait être l'adjonction d'anticorps Anti-*Pg* lors d'un traitement dentaire afin de réduire la charge bactérienne liée spécifiquement à cette espèce bactérienne retrouvée en majorité dans les pathologies dentaires (**Figure 30 Outlook 1**).

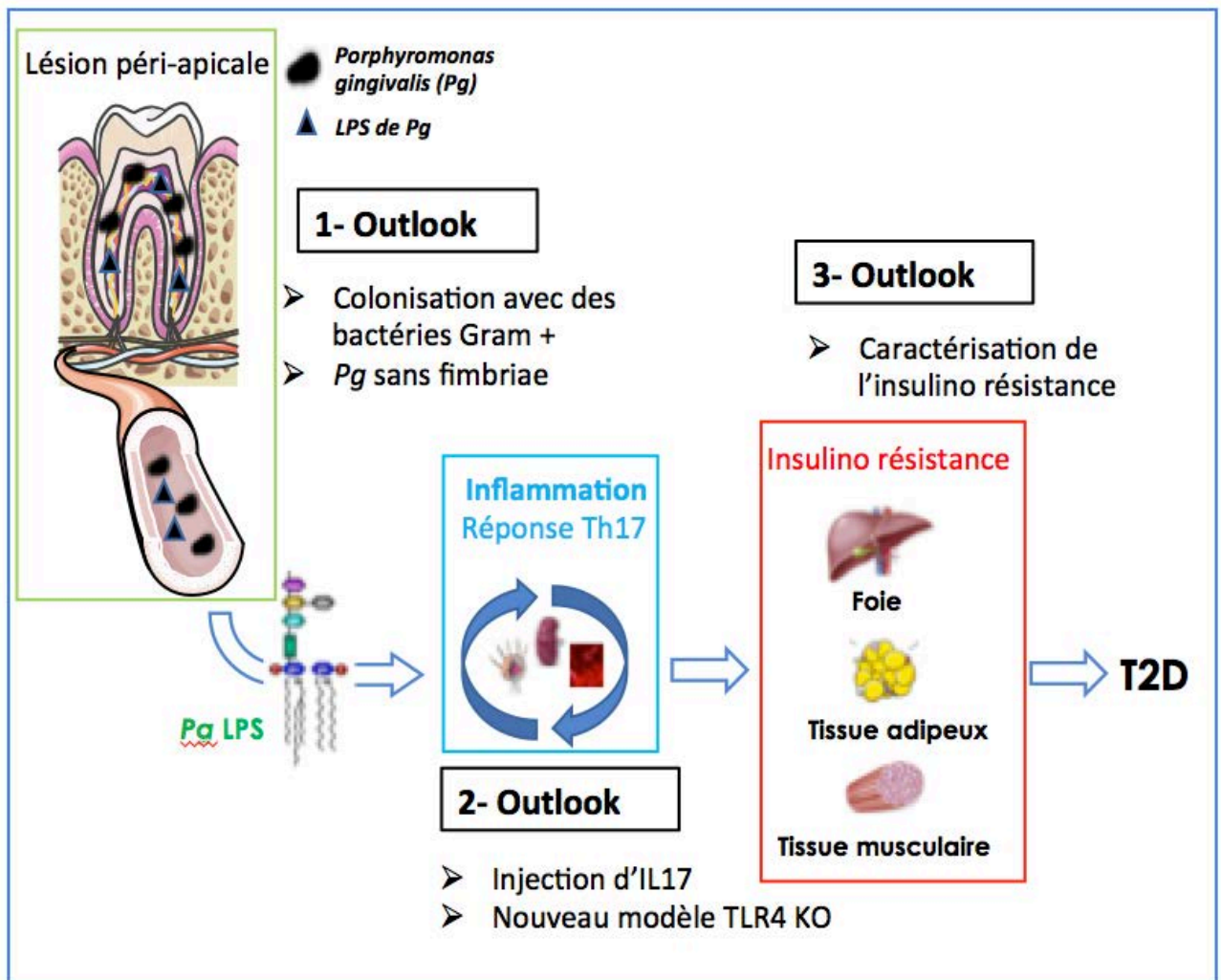


Figure 36: Schéma linéaire de synthèse des résultats obtenus et des perspectives de ce travail

La colonisation endodontique par *Porphyromonas gingivalis* induit une lésion péri-apicale aggravée par la présence de son LPS. Le LPS de Pg induit une réaction immunitaire locale et systémique à profil Th17 aggravant l'intolérance au glucose induit par un régime HFD caractérisant le DT2.

Porphyromonas gingivalis (Pg) joue un rôle essentiel dans les cancers oraux (230) (231), faisant de Pg un acteur majeur localement dans les pathologies parodontales mais aussi globalement pour échapper au système immunitaire de l'hôte et éventuellement affecter la santé systémique (232).

Nos résultats montrent que *Pg* entraîne une réponse locale et systémique (**Figure 34**) immunitaire à profil Th17. Cette réaction pro-inflammatoire est connue pour son effet délétère sur les maladies systémiques.

Afin d'identifier si le niveau d'implication de cette réaction immunitaire à profil Th17 est primordiale, voir réversible, dans les effets délétères systémiques de *Pg*, nous nous proposons de compléter les souris IL17 KO avec de IL17 afin de constater si un retour à l'état initial d'un point de vue métabolique et immunitaire est possible (**Figure 30 Outlook 2**).

Les résultats permettront d'identifier le rôle fondamental de l'IL17 dans l'altération de la tolérance au glucose induite par la colonisation de *Pg* dans le contexte d'un Régime Hyper Lipidique (HFD).

En parallèle, nous pourrions également renouveler les expériences de colonisation par *Pg* chez des souris sauvages avec une injection chronique d'interleukine 17 afin de renforcer la réaction immunitaire à profil Th17 (**Figure 30 Outlook 2**)

Nous avons aussi la possibilité de travailler sur des souris WT colonisées avec *Pg*, cette fois ci avec injection d'anticorps neutralisant anti-IL17 afin d'éviter le dérèglement immunitaire retrouvé chez les souris KO.

Le lien entre LPS et IL17 a déjà été démontré dans un modèle de lésion pulmonaire induit par LPS (233) dont l'inflammation est réduite en les supplémentant en anticorps IL17 mais aussi en utilisant des antagonistes d'IL17 diminuant la voie de signalisation de MAP kinase et de NFkappa B (234).

On imagine donc bien l'intérêt clinique de ces antagonistes contre IL17 pour diminuer l'inflammation locale et systémique entretenant une insulino-résistance. Ce traitement a déjà montré ces effets à travers de nombreuses études pour lutter contre des inflammations chroniques, notamment la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis (235) (236) (237) avec pour traitement un nouvel immunosuppresseur déjà commercialisé, l'anticorps anti IL17A, indiqué dans la prise en charge du Psoriasis en Plaques, du Rhumatisme Psoriasique et de la Spondylarthrite Ankylosante (SPA). Son principe actif, le Sécukinumab, (distribué en France par le Laboratoire Centre Spécialités Pharmaceutiques (CSP) sous le nom de Cosentyx) est le premier représentant d'une nouvelle classe thérapeutique, celle des anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement l'interleukine 17A (238).

Les résultats de nos recherches mettent aussi en évidence une intolérance au glucose aggravée par la colonisation par *Pg* (**Figure 33**). Nous nous posons la question de l'action de ces désordres sur le métabolisme glucidique. Aussi nous proposons de réaliser une analyse de l'insulino-résistance par clamp euglycémique hyper insulinémique dans nos modèles, afin de caractériser les atteintes métaboliques dans l'organisme.

Le Lipopolysaccharide (LPS) de *Pg* est capable de se lier à son récepteur principal le TLR4 et d'induire le signal de production de cytokines pro-inflammatoires par l'activation du facteur de transcription NF-kB dans les organes cibles de l'insuline comme le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique. Lors de notre étude, nous avons collectés ces organes et nous prévoyons d'évaluer l'activation de la voie de signalisation du TLR4 et du facteur de transcription NF-kB par Western blot (**Figure 30 Outlook 2**).

Afin de tester l'implication de la voie TLR4-NFkB dans ces processus physiopathologiques, nous souhaitons réaliser des expériences similaires (Colonisation/HFD) chez des animaux TLR4 KO, un modèle précédemment utilisé dans la littérature pour l'étude des dysbioses intestinales. (239) (95) (**Figure 30 Outlook 2**).

Enfin, après avoir montré que *Porphyromonas gingivalis* aggrave l'intolérance au glucose au cours du diabète de type 2, nous proposons de caractériser cette insulino résistance dans les trois organes insulino sensibles (foie, tissus adipeux et tissus musculaire) par analyse type Western Blot de la voie de signalisation de l'insuline (**Figure 30 Outlook 3**).

5 PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES

Nos études montrent le lien bidirectionnel existant entre un microbiote oral dysbiotique et la régulation glycémique. La prise en charge du microbiote oral devient donc un axe majeur pour les praticiens. Il devient fondamental pour tout praticien de savoir identifier des marqueurs bactériens oraux pouvant servir comme outil de diagnostic.

Cette stratégie est rendue d'autant plus intéressante par la facilité d'accès, de façon non invasive et peu onéreuse, aux prélèvements buccaux, et par la disponibilité en quantité quasi-illimitée de ceux-ci.

Les maladies buccales sont maintenant considérées comme la conséquence d'un changement délétère du microbiote buccal. Comme nous avons vu précédemment, il existe un lien entre parodontite et diabète. En effet, le traitement de la parodontite réduit l'HbA1c chez le patient DT2 (240) (241) et de nombreuses études montrent l'effet d'un traitement parodontal antimicrobien sur le TNF alpha (242) (243). Ainsi, les antibiotiques et le traitement mécanique de la parodontite ont un effet bénéfique sur le diabète de type 2.

A l'aube d'une nouvelle médecine de moins en moins invasive, nous nous posons la question du bienfait d'éradiquer à large spectre les bactéries buccales. Il est de plus en plus nécessaire de lutter contre la résistance microbienne due aux traitements antibiotiques et de neutraliser les bactéries causales. Il apparaît évident que l'utilisation des pré/probiotiques pouvant conduire à de nouvelles stratégies de prévention devient indispensable (244). Ceci a déjà été fait pour le microbiote intestinal avec l'utilisation de probiotiques spécifiques, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* et *Bifidobacterium catenulatum*, pour traiter les lésions hépatiques en atténuant la D-galactosamine (245). Chez la souris, le traitement par le probiotique *Bifidobacterium pseudocatenulatum* réduit l'obésité et l'inflammation par l'amélioration de la barrière épithéliale de la cavité buccale (246) (247). Nos résultats permettent d'obtenir une grande banque de données facilitant l'identification de nouveaux probiotiques issus des microbiotes oraux dans la régulation métabolique.

En tant que praticien de santé nous devons proposer des thérapeutiques innovantes pour résoudre la prévalence et la comorbidité des maladies métaboliques. Pour ceci, il faut prendre en compte les facteurs de risques et les biomarqueurs des pathologies systémiques comme le diabète, l'obésité et la Stéatose Hépatique Non-alcoolique (NASH). Nos travaux mettent en évidence le candidat bactérien *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) dans l'aggravation de l'insulino-résistance avec l'implication de son LPS et d'une voie immunitaire, celle des Th17. Les travaux en cours permettront de préciser le rôle de l'IL17 et de proposer des applications thérapeutiques novatrices, comme la prescription de molécules bloquant soit l'IL17, soit le LPS de *Pg*, tel le LPS-Binding Protein (LBP), une protéine impliquée dans la réponse inflammatoire induite par les LPS. L'utilisation de LBP pourrait bloquer le transport systémique des molécules antigéniques bactériennes et ainsi éviterait le développement d'une inflammation dans les organes métaboliques prédisposant aux maladies métaboliques. Nous avons développé également des anticorps Anti-*Pg* qui pourraient s'avérer une nouvelle solution thérapeutique pour lutter contre le développement d'une lésion péri- apicale ou contre la parodontite.

L'Innovation technologique

Notre étude clinique portant sur les biomarqueurs salivaires impliqués dans la régulation de la glycémie (11) a été le début d'un projet technologique innovant en santé publique. En effet, ces résultats identifient un biomarqueur biochimique salivaire, la lipase salivaire, qui est corrélée avec la glycémie sanguine. Ceci a donné lieu à un projet, que nous poursuivons actuellement, de détection des variations de la glycémie des patients diabétiques via un capteur buccal détectant les variations de lipase salivaire. La salive est décrite aujourd'hui comme un nouveau fluide d'intérêt majeur dans la détection des paramètres systémiques (248). Des biomarqueurs salivaires tels ceux identifiés ici permettront la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques pour prévenir la prévalence de ces pathologies.

Une possibilité pour aller plus loin dans l'innovation technologique réside dans la création des biocapteurs incorporés dans les dents et mesurant les niveaux de ces marqueurs. Ces biocapteurs pourraient être la prochaine approche pour surveiller en continu l'état métabolique d'un individu.

À l'avenir, il pourrait également être possible de développer des biocapteurs pour quantifier les enzymes ou les bactéries présentes dans la cavité buccale. Mannoor et al. ont proposé une première version d'une « dent connectée » (249). Ces auteurs ont rapporté la « greffe » sur une dent d'un « nanocapteur » en graphène exploitant des peptides antimicrobiens (anti-microbial peptides ou AMP) existant dans la nature pour détecter certaines espèces comme *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* ou *Staphylococcus aureus*. Ils ont montré qu'il était possible de détecter la liaison d'une seule bactérie sur un capteur, ce qui confirme l'idée que les biocapteurs incorporés dans les dents pourraient éventuellement être utilisés pour surveiller en permanence les états pathologiques. Cela appuierait la proposition de David Wong selon laquelle « le liquide buccal (la salive), le miroir du corps, est un moyen parfait à explorer pour la surveillance de la santé et des maladies » (250).

Remèdes naturels

D'autres stratégies thérapeutiques nouvelles existent, et on peut citer ici la phytothérapie, avec par exemple la Puéararine ou Kudzu, un ingrédient actif dans la racine de la *Pueraria Lobate*, suggérée pour avoir un puissant effet anti-obésité. Le traitement par la Puéararine augmente l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* protégeant ainsi la fonction de barrière intestinale en augmentant l'expression de ZO-1 et d'Occludine. (251).

Il existe un autre lien entre la parodontite et les troubles métaboliques : le taux de Vitamine D (252) (253) (254) (255). La relation entre la carence en vitamine D et la résistance à l'insuline pourrait s'expliquer par l'inflammation, car la carence en vitamine D est associée à une augmentation des marqueurs inflammatoires, à la résistance initiale à l'insuline et à l'apparition ultérieure du diabète causée par la mort des cellules β .

En fait, nous savons qu'une parodontite chronique (256) est associée à un faible taux de vitamine D et plus précisément à un faible taux sérique de 1,25(OH)₂D. Ce type de lien correspond aux associations précédemment rapportées entre le sérum 1,25(OH)₂D et d'autres maladies inflammatoires (257) (258). Des études épidémiologiques ont montré une association entre une faible concentration sérique de 25-hydroxyvitamine D₃ (25(OH) D₃) et un risque accru de syndrome métabolique et de diabète de type 2. Cela peut s'expliquer en partie par une augmentation de la masse grasseuse (255). De plus, les polymorphismes

génétiqes liés à la vitamine D peuvent prédisposer à une altération du contrôle glycémique et au diabète de type 2 (259).

6 CONCLUSION

Effectuant une thèse en biologie en tant que chirurgien-dentiste, et au moment d'une des plus grandes pandémies que le monde n'ait récemment jamais connues, nous avons l'obligation de réfléchir au rôle que doit jouer le chirurgien-dentiste dans la santé globale de ses patients. A partir des résultats et postulats développés dans cette thèse, nous nous proposons de participer à trois axes majeurs :

◆ Une médecine personnalisée.

Nous avons vu que les sportifs de haut niveau avaient des problèmes dentaires particuliers et que les hommes et les femmes ne sont pas égaux dans leurs paramètres métaboliques buccaux. Ce deuxième concept, de différenciation sexuelle, a été ignoré pendant des décennies, par exemple dans les essais cliniques, aujourd'hui ce concept est de plus en plus étudié (260).

Plus généralement, une analyse des biomarqueurs de la salive, tel que pratiquée ici, sera un guide précieux pour le choix des stratégies thérapeutiques dans l'avenir.

◆ Une médecine globale.

Nous l'avons déjà constaté : « *Bucca sana in corpore sana* ». Notre corps est un ensemble, ou plutôt *deux* ensembles avec les microbiotes, dans lequel tout est relié. Se brosser les dents peut donc nous protéger des maladies métaboliques comme le diabète de type 2 ! En qualité de chirurgien-dentiste, nous nous devons désormais, de soigner les patients diabétiques en concertation avec nos collègues de Diabétologie en tant qu'acteurs à part entière. Nous devons désormais collaborer avec les mêmes collègues dans nos recherches sur le microbiote oral au cours du diabète. Ces études cliniques permettront de proposer de nouvelles pistes pour le soin du microbiote oral et de ses effecteurs comme la réaction immunitaire TH17 pour traiter ces pathologies systémiques.

◆ Une médecine connectée.

En effet, nous avons testé la salive pour identifier des biomarqueurs au cours de la régulation glycémique. Notre but actuel est d'identifier les marqueurs causaux pouvant servir de marqueurs spécifiques des modifications glycémiques. Nous proposons donc que des dents « connectées » puissent incorporer des puces permettant de suivre les

marqueurs salivaires identifiés dans le contrôle ou la prévention des divers aspects de notre santé générale.

7 ANNEXES 1 : TABLEAUX

Paramètres	Groupe témoin (n=30)	Groupe de joueurs de rugby professionnels (n=33)	Valeur p
Âge (années)	26,07 ± 3,76	26,97 ± 4,58	p=0,1801
Poids (kg)	76,87 ± 10,02	102,18 ± 13,86	p=8,58x 10⁻¹²
Hauteur (m)	1,79 ± 0,073	1,85 ± 0,07	p=0,0009
IMC (kg/m ²)	23,96 ± 3,44	29,79 ± 3,44	p=1.0679x10⁻¹⁰
Stress Score	2,67 ± 1,54	3,22 ± 2,68	p=0,1628
Indice DMF	2,4 ± 3,36	4,36 ± 4,59	p=0,0216
Cariés (C)	0,53 ± 1,46	1,09 ± 1,79	p=0,0914
Absentes (A)	0,17 ± 0,53	0,76 ± 1,98	p=0,0489
Obturés (O)	1,7 ± 2,69	2,52 ± 2,75	p=0,1200
INDICE SIC	6,3	9,2	/
Saignement avec sonde (BOP)	23,23 ± 14,53	23,96 ± 23,35	p=0,8587
Indice de Plaque (IP)	2,40 ± 3,64	9,36 ± 12,78	p=0,1710
Indice Loe Sillness (LSI)	0,15 ± 0,16	0,34 ± 0,41	p=0,9666
Diagnostic de la gingivite	5 (16,67%)	17 (51,52%)	Odds ratio : 5.1657 IC 95% [1.4589 ; 21.622] p=0,0074
pH de la salive	7,55 ± 0,53	7,84 ± 0,44	p=0,0429
Bilan dentaire au cours des 12 derniers mois	23 (76,67%)	14 (42,42%)	p=0,0099
Suffisamment d'information sur la santé buccodentaire	15 (50%)	28 (84,85%)	p=0,0060

Tableau 1: Bilan de la santé dentaire de la cohorte

Paramètres	Groupe témoin (n=30)	Groupe de rugby professionnel (n=33)	Valeur p
Nombre de repas par jour	2,86 ± 0,64	3,97 ± 1,19	p=0,0002
Nombre de collations par jour	0,52 ± 0,60	1,39 ± 0,83	p=0,0001
Nombre de produits laitiers par semaine	6,09 ± 4,32	7,42 ± 5,32	p=0,30
Nombre de fromages par semaine	4,19 ± 4,12	3,22 ± 3,33	p=0,37
Nombre de protéines par semaine	7,59 ± 3,74	10,51 ± 6,29	p=0,04
Nombre d'amidons par semaine	8,64 ± 4,8	10,21 ± 8,25	p=0,37
Nombre de légumes par semaine	6,73 ± 4,88	6,72 ± 4,26	p=0,98
Nombre de fruits par semaine	4,73 ± 3,55	6,60 ± 5,78	p=0,15
Nombre de charcuteries par semaine	2,09 ± 1,54	1,73 ± 2,50	p=0,68
Nombre de fritures par semaine	2,73 ± 3,74	1,15 ± 1,25	p=0,04
Nombre de gratins par semaine	2,57 ± 3,95	1,68 ± 2,28	p=0,54
Nombre de pizzas par semaine	1,98 ± 3,72	0,67 ± 0,44	p=0,065
Nombre de plats en sauce par semaine	1,39 ± 1,71	1,85 ± 1,71	p=0,29
Nombre de pâtisseries / Crème glacée par week-end	1,5 ± 1,54	1,30 ± 1,73	p=0,69
Nombre de chocolat par semaine	2,16 ± 2,38	1 ± 1,98	p=0,068
Nombre de gâteaux par semaine	2,05 ± 2,24	2,30 ± 3,43	p=0,66
Nombre de collations par semaine	1,53 ± 1,22	0,59 ± 1,38	p=0,001
Nombre de fast-food par semaine	1,11 ± 0,99	0,77 ± 0,68	p=0,15
Nombre de jus de fruits par semaine	4,45 ± 2,95	5,58 ± 5,69	p=0,32
Nombre de sodas par semaine	2,14 ± 1,98	0,88 ± 1,60	p=0,01
Alcool	2,41 ± 1,84	0,81 ± 0,83	p=0,0001

Tableau 2 : Habitudes dans l'apport alimentaire

Type d'alimentation / semaine	Hommes (n=10)	Femmes (n=10)	Valeur p (Homme vs Femme)
Produits laitiers	8,11 ± 6,05	7,71 ± 3,19	0,6564
Fromage	5,61 ± 6,46	3,23 ± 2,75	0,5420
Viande & Poisson	9,89 ± 4,14	7,96 ± 3,43	0,5420
Glucides	12,89 ± 7,82	8,71 ± 3,53	0,2921
Légumes	8,44 ± 3,61	9,04 ± 2,97	0,9703
Fruits frais	6,44 ± 4,72	8,54 ± 5,03	0,1427
Viande froide	3,33 ± 2,50	1,69 ± 1,92	0,1582
Fritures	1,42 ± 1,02	1,04 ± 0,77	0,4141
Pizza	1,00 ± 0,97	0,71 ± 0,32	0,7359
Quiche	0,50 ± 0,43	0,83 ± 0,48	0,1544
Plats à la sauce	0,75 ± 0,47	2,27 ± 2,49	0,0974
Gâteaux & Glaces	0,89 ± 1,05	0,81 ± 0,78	0,8257
Chocolat	0,67 ± 2,00	0,81 ± 2,03	0,3180
Biscuit	1,44 ± 2,46	2,15 ± 2,66	0,3924
Biscuit apéritif	1,58 ± 1,56	0,83 ± 0,68	0,2812
Restauration rapide	0,64 ± 0,44	0,60 ± 0,43	0,8762
Jus de fruits	4,78 ± 3,03	4,38 ± 2,67	0,7103
Sodas	1,83 ± 1,90	0,50 ± 0,67	0,0471*
Alcool	1,03 ± 0,81	1,42 ± 1,08	0,4435

Tableau 3 : Habitudes alimentaires des Hommes et des Femmes de la cohorte

	Sujets (n=20)	Hommes (n=10)	Femmes (n=10)	Valeur p (Hommes vs Femmes)
Age (années)	23,90 ± 2,14	23,67 ± 1,12	24,08 ± 2,60	0,8189
Poids (kg)	61,28 ± 12,42	72,33 ± 10,74	53,00 ± 4,51	< 0,0001 ***
Taille (cm)	169,95 ± 9,03	178,00 ± 6,36	163,92 ± 4,91	0,0003**
Nombre de brossage / jour	2,21 ± 0,4	2,11 ± 0,33	2,29 ± 0,43	0,2927
Temps de brossage en min.	1,84 ± 0,32	1,78 ± 0,26	1,90 ± 0,35	0,1060
Nombre de visite chez le dentiste / an	0,99 ± 0,56	0,64 ± 0,28	1,25 ± 0,56	0,0111*
État carieux CAO	0,80 ± 0,92	0,78 ± 0,83	0,83 ± 0,98	0,80
Plaque index (PI)	0,85 ± 1,01	1 ± 1,12	0,75 ± 0,92	0,89
Saignements (BOP)	0,86 ± 1,52	0,89 ± 1,7	0,83 ± 1,40	0,87
Niveau de stress sur une échelle de 1 à 10	2,33 ± 1,79	1,22 ± 0,44	3,17 ± 1,91	0,0031*

Tableau 4 : Paramètres cliniques et buccaux (moyennes ± SD. *p<0,05. **p<0,01. *p<0,0001. Test de Mann-Whitney non apparié).**

<i>Paramètres biologiques dans la salive</i>	A jeun	Nourri	Valeur p
Amylase (U/L)	972,34 ± 418,57	968,38 ± 443,34	0,968
Lipase (U/L)	27,894 ± 25,71	12,28 ± 4,85	0,0126*
Cholestérol (mmol/L)	0,53 ± 0,30	0,15 ± 0,14	<0,0001 ***
Glucose (mmol/L)	0,03 ± 0,02	0,48 ± 1,79	0,3476
Protéines Totales (g/L)	13,20 ± 4,31	9,02 ± 6,98	0,0168*
Triglycérides (mmol/L)	0,15 ± 0,12	0,11 ± 0,14	0,2282
Acides gras libres (AGL) (mmol/L)	0,15 ± 0,14	0,072 ± 0,079	0,0078*
<i>Paramètres biologiques dans le sang</i>	A jeun	Nourri	Valeur P
Glucose sanguin (mg/dL)	87,42 ± 7,46	110,71 ± 21,82	<0,0001 ***

Tableau 5 : Comparaison des paramètres biologiques de la salive et du sang en conditions à jeun et nourri. (Moyenne ± SD, *p<0,05, **p<0,01, **p<0,0001, Test de Mann-Whitney non apparié).**

Paramètres biologiques	A jeun			Nourri			Valeur p	
	Hommes (H) (n=10)	Femmes (F) (n=10)	Valeur p (H vs F)	Hommes (n=10)	Femmes (n=10)	Valeur p (H vs F)	Hommes à jeun vs Hommes nourris	Femmes à jeun vs Femmes nourries
Salive								
Amylase (U/L)	792,14 ± 444,19	1107,50 ± 343,30	0,1658	920,57 ± 523,04	1004,2 ± 377,1	0,6798	0,4989	0,3377
Lipase (U/L)	35,10 ± 27,52	22,49 ± 23,00	0,3554	12,97 ± 4,29	11,77 ± 5,14	0,5869	0,0484*	0,1532
Cholestérol (mmol/L)	0,71 ± 0,26	0,40 ± 0,27	0,0329*	0,12 ± 0,073	0,18 ± 0,17	0,3501	0,002**	0,0559
Glucose (mmol/L)	0,05 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,2933	1,412 ± 3,10	0,017 ± 0,009	0,1900	0,3650	0,3607
Protéines Totales (g/L)	13,83 ± 2,55	12,74 ± 5,12	0,5458	10,09 ± 7,38	8,23 ± 6,59	0,5611	0,1621	0,0672
Triglycérides (mmol/L)	0,24 ± 0,15	0,09 ± 0,04	0,0060**	0,17 ± 0,21	0,072 ± 0,041	0,1252	0,3422	0,4336
Acides Gras Libres (GGL) (mmol/L)	0,25 ± 0,18	0,08 ± 0,06	0,0049**	0,07 ± 0,06	0,073 ± 0,09	0,9021	0,055	0,4511
Sang								
Glucose sanguin (mg/dL)	88,00 ± (6,38)	87,00 ± 8,07	0,9149	102,44 ± 14,03	116,9 ± 25	0,1362	0,0084**	0,0021**

Tableau 6: Comparaison des paramètres biologiques de la salive et du sang entre les hommes et les femmes en conditions à jeun et nourris. (Moyenne ± SD, *p<0,05, **p<0,01, *p<0,0001, Test de Mann-Whitney non apparié).**

	Paramètres du microbiote	A jeun (tous les sujets n = 20)	Nourri (tous les sujets n = 20)	Valeur p (à jeun vs nourri)
Abondance Relative (%) dans le microbiote oral	α-diversité pour l'indice de Shannon	2,44 ± 0,19	2,42 ± 0,22	0,8502
	α-diversité pour l'indice de Chao	58,99 ± 7,17	63,27 ± 6,23	0,0171*
Phylum	<i>Actinobacteria</i>	4,67 ± 2,66	4,97 ± 2,10	0,6583
	<i>Bacteroidetes</i>	38,93 ± 9,09	21,49 ± 9,09	0,00055**
	<i>Firmicutes</i>	22,06 ± 7,96	33,21 ± 9,75	0,00123**
	<i>Fusobacteri</i>	9,73 ± 3,53	9,39 ± 4,66	0,8262
	<i>Proteobacteria</i>	24,02 ± 11,57	30,65 ± 12,91	0,1345
	<i>SR1 (Absconditabacteria)</i>	0,3 ± 0,63	0,24 ± 0,54	0,76645
	<i>Saccharibacteria</i>	0,04 ± 0,04	0,02 ± 0,02	0,0493*
	<i>Spirochaetae</i>	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,03	0,176
Familles	<i>Bacteroidaceae</i>	0	0,02 ± 0,09	0,035*
	<i>Burkholderiaceae</i>	0,29 ± 0,29	0,7 ± 0,82	0,0419*
	<i>Caulobacteraceae</i>	0,02 ± 0,05	0	0,0358*
	<i>Comamonadaceae</i>	0,31 ± 1,17	0,1 ± 0,15	0,48931
	<i>Peptostreptococcaceae</i>	0,53 ± 0,45	0,24 ± 0,24	0,0327*
	<i>Prevotellaceae</i>	34,45 ± 9,30	17,43 ± 9,03	0,00055**
	<i>Rhodobacteraceae</i>	0	0,08 ± 0,30	0,0228*
	<i>Sphingomonadaceae</i>	0	0,01 ± 0,04	0,1345
	<i>Streptococcaceae</i>	13,53 ± 7,47	24,56 ± 9,32	0,00055**

Genres	<i>Actinobacillus</i>	0,03 ± 0,07	0,6 ± 0,30	0,0910*
	<i>Aggregatibacter</i>	0,09 ± 0,07	0,27 ± 0,35	0,0377*
	<i>Bacteroides</i>	0	0,02 ± 0,09	0,035*
	<i>Bergeyella</i>	0,29 ± 0,24	0,47 ± 0,29	0,0305*
	<i>Butyrivibrio 2</i>	0,17 ± 0,17	0,03 ± 0,03	0,001*
	<i>Lautropia</i>	0,29 ± 0,29	0,7 ± 0,82	0,040*
	<i>Oribacterium</i>	1,12 ± 0,04	2,14 ± 1,42	0,0123*
	<i>Paracoccus</i>	0	0,08 ± 0,30	0,022*
	<i>Prevotella</i>	5,06 ± 2,79	2,62 ± 1,98	0,00055**
	<i>Prevotella 6</i>	1,32 ± 1,24	0,56 ± 0,55	0,00183
	<i>Prevotella 7</i>	26,37 ± 8,62	13,10 ± 7,96	< 0,0001***/ 0,00055
	<i>Prevotella 9</i>	0	0,03 ± 0,07	0,0269
	<i>Streptococcus</i>	13,53 ± 7,47	24,56 ± 9,32	0,00055
	<i>Sphingomonas</i>	0	0,01 ± 0,04	0,129

Tableau 7: Abondance relative (%) pour le phyla taxonomique, la famille et les genres identifiés avec des différences significatives dans le microbiote oral (salive) (données comme ± SD moyen) dans des conditions de jeûne et nourries. (données comme ± SD moyenne, *p<0,05, **p<0,01, **p<0,0001, test Mann Whitney non apparié).**

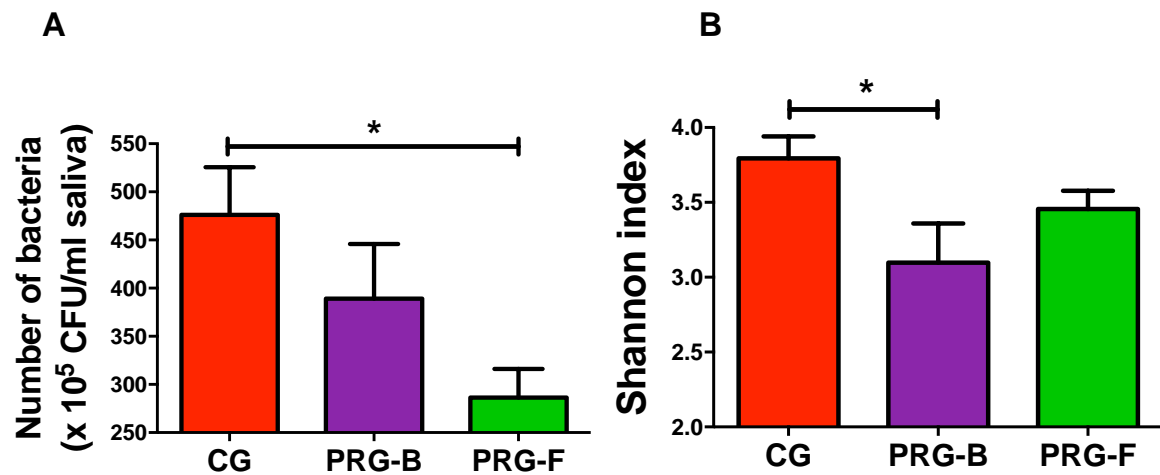
	Paramètres microbiens	A jeun			Nourri			Valeur p	
Relative abondance (%) dans le microbiote oral		Hommes (n=10)	Femmes (n=10)	Valeur p (H vs F)	Hommes (n=10)	Femmes (n=10)	Valeur p (H vs F)	Valeur p A jeun Hommes vs nourris Hommes	Valeur p A jeun Femmes vs nourries Femmes
	α-diversité pour l'indice de Shannon	60,57 ± 6,13	57,61 ± 8,11	0,56	65,51 ± 5,16	62,02 ± 6,71	0,2935	0,063*	0,19
	α-diversité pour l'indice de Chao	2,45 ± 0,22	2,43 ± 0,18	0,86	2,58 ± 0,14	2,30 ± 0,19	0,0036*	0,16	0,11
Phyla	<i>Actinobacteria</i>	4,54 ± 2,18	4,77 ± 2,96	0,999	4,60 ± 1,96	5,27 ± 2,15	0,602	0,99	0,78
	<i>Bacteroidetes</i>	42,37 ± 7,60	35,84 ± 9,07	0,265	24,18 ± 8,15	19,30 ± 9,15	0,353	0,0072**	0,021*
	<i>Firmicutes</i>	23,86 ± 8,51	20,43 ± 7,12	0,54	35,98 ± 10,53	30,95 ± 8,51	0,37	0,144	0,023*
	<i>Fusobacteria</i>	8,77 ± 2,86	10,60 ± 2,86	0,27	10,52 ± 4,88	8,47 ± 4,28	0,353	0,66	0,411
	<i>Proteobacteria</i>	19,80 ± 11,90	27,82 ± 9,86	0,27	24,18 ± 9,01	35,95 ± 12,90	0,134	0,69	0,43
	<i>SR1 Absconditabacteria</i>	0,62 ± 0,81	0,01 ± 0,02	0,19	0,49 ± 0,75	0,03 ± 0,03	0,190	0,87	0,39
	<i>Saccharibacteria</i>	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,04	0,65	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,513	0,79	0,08
	<i>Spirochaetae</i>	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,56	0,03 ± 0,04	0,01 ± 0,02	0,134	0,58	0,78
Familles	<i>Coriobacteriaceae</i>	0,203 ± 1,61	0,790 ± 0,003	0,17	0,293 ± 0,292	0,168 ± 0,124	0,285	0,69	0,023*
	<i>Lentimicrobiaceae</i>	0,011 ± 0,010	0,006 ± 0,014	0,26	0,058 ± 0,063	0,014 ± 0,030	0,009**	0,080	0,78
	<i>Moraxellaceae</i>	0,006 ± 0,007	0,012 ± 0,020	0,52	0,031 ± 0,062	0,005 ± 0,006	0,05*	0,55	0,78
	<i>Pasteurellaceae</i>	9,864 ± 7,024	14,825 ± 9,416	0,413	12,925 ± 6,154	21,236 ± 10,220	0,08	0,62	0,39
	<i>Porphyromonadaceae</i>	4,781 ± 2,690	2,774 ± 3,019	0,27	3,267 ± 1,709	1,871 ± 1,451	0,08	0,57	0,79

Genres	<i>Acinetobacter</i>	0,004 ± 0,006	0,009 ± 0,021	0,95	0,025 ± 0,052	0,003 ± 0,005	0,08	0,55	1
	<i>Atopobium</i>	0,200 ± 0,159	0,782 ± 1,043	0,17	0,285 ± 0,292	0,161 ± 0,119	0,28	0,69	0,023*
	<i>Capnocytophaga</i>	1,076 ± 0,615	0,608 ± 0,390	0,26	1,545 ± 1,557	0,628 ± 0,552	0,05*	0,90	0,78
	<i>Delftia</i>	0,004 ± 0,009	0,483 ± 1,531	0,19	0,051 ± 0,075	0,044 ± 0,015	0,26	0,04*	0,39
	<i>Dialister</i>	0,093 ± 0,071	0,092 ± 0,083	/ 0,99	0,115 ± 0,108	0,071 ± 0,071	0,05*	0,97	0,21
	<i>Eikenella</i>	0,084 ± 0,043	0,031 ± 0,053	0,05*	0,063 ± 0,050	0,053 ± 0,081	0,39	0,62	0,43
	<i>Haemophilus</i>	9,696 ± 7,089	14,70 ± 9,346	0,36	12,271 ± 6,281	20,920 ± 9,998	0,08	0,62	0,39
	<i>Johnsonella</i>	0,032 ± 0,04	0,014 ± 0,032	0,197	0,059 ± 0,078	0,020 ± 0,040	0,05	0,62	0,43
	<i>Kingella</i>	0,018 ± 0,026	0,001 ± 0,003	0,197	0,015 ± 0,023	0,004 ± 0,010	0,26	0,79	0,78
	<i>Porphyromonas</i>	4,637 ± 2,704	2,575 ± 3,092	0,244	2,976 ± 1,709	1,698 ± 1,515	0,08	0,57	0,78
	<i>Stomatobaculum</i>	0,744 ± 0,520	0,539 ± 0,526	0,250	0,746 ± 0,371	0,360 ± 0,258	0,05	0,94	0,78

Tableau 8 : Abondance relative (%) pour le phyla taxonomique, la famille et les genres identifiés avec des différences significatives dans le microbiote oral (salive) (données comme \pm SD moyen) entre mâle et femelle dans les deux conditions à jeun et nourries, (données comme moyenne \pm SD, * $p < 0,05$ **, $p < 0,01$ **, $p < 0,0001$, essai Mann-Whitney non apposé),**

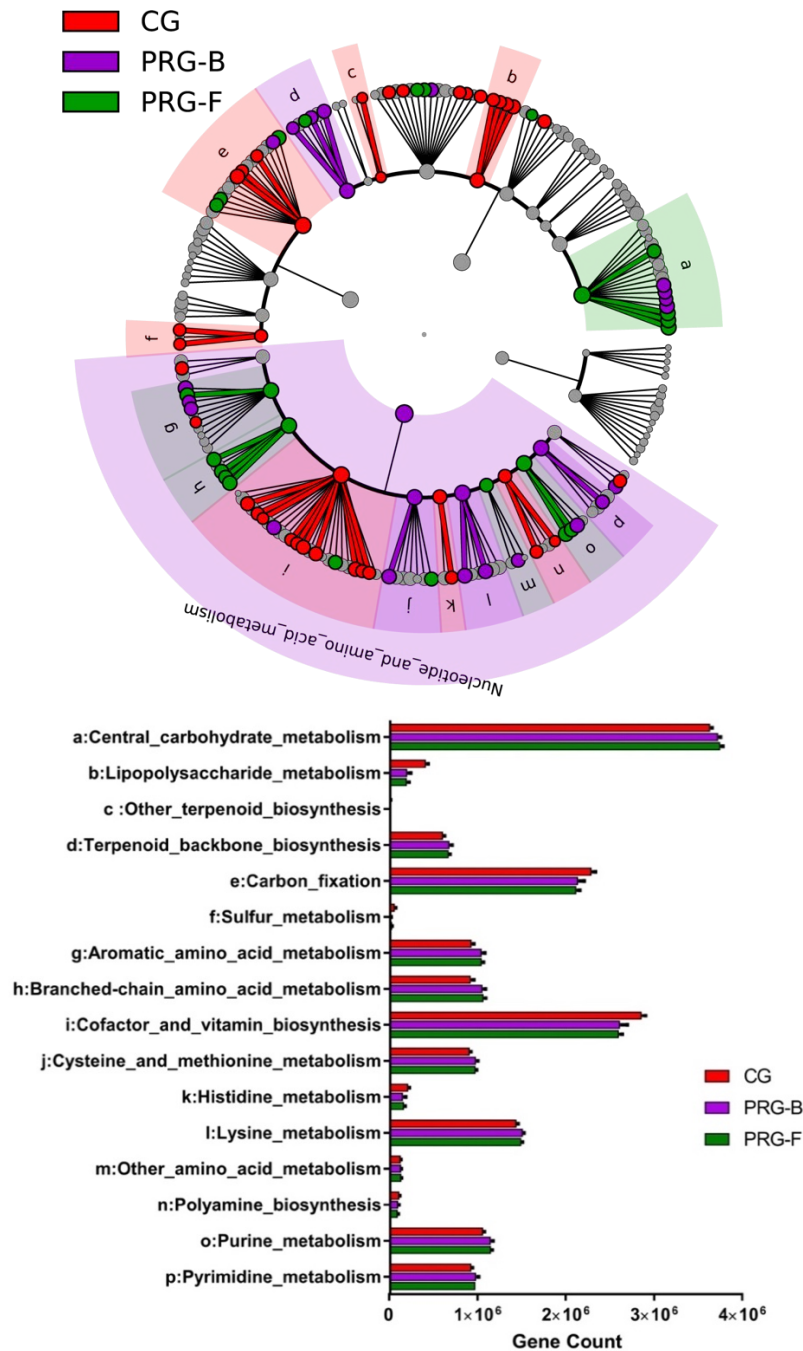
8 ANNEXES 2 :

FIGURES SUPPLEMENTAIRES



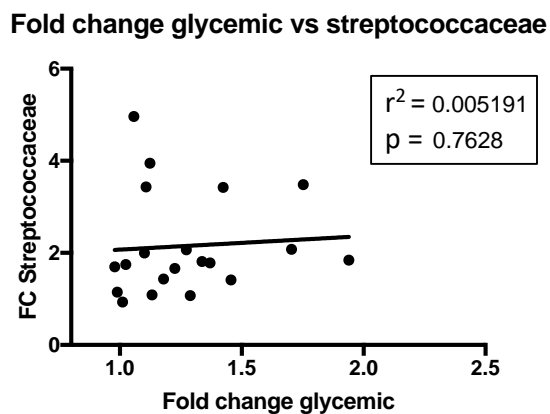
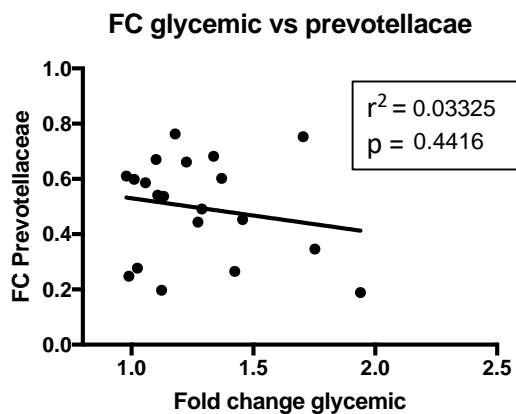
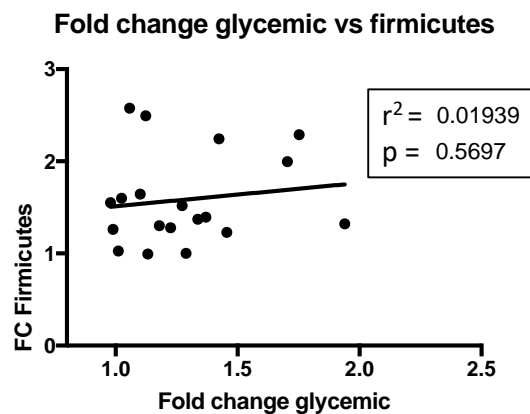
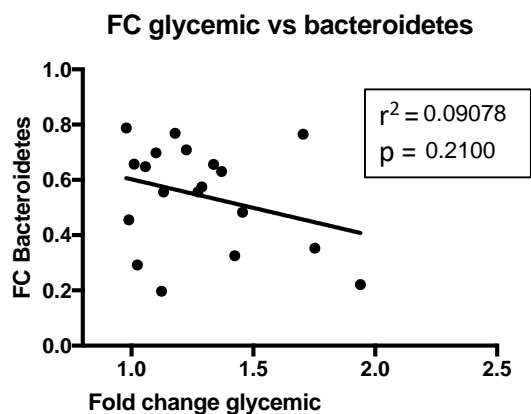
Suppl. Figure 1 : Dysbiose du microbiote salivaire dans le groupe de joueurs de Rugby professionnels selon leurs postes (arrières vs avants) comparée au groupe témoin.

- A) Nombre d'UFC (Unités de Formation de Colonies) dans la salive des membres du groupe témoin (CG = control group) et du groupe de joueurs de Rugby (PRG = professional Rugby players group), des lignes arrières PRG-B vs les avants PRG-F*
- B) Alpha-diversité selon l'indice Shannon*

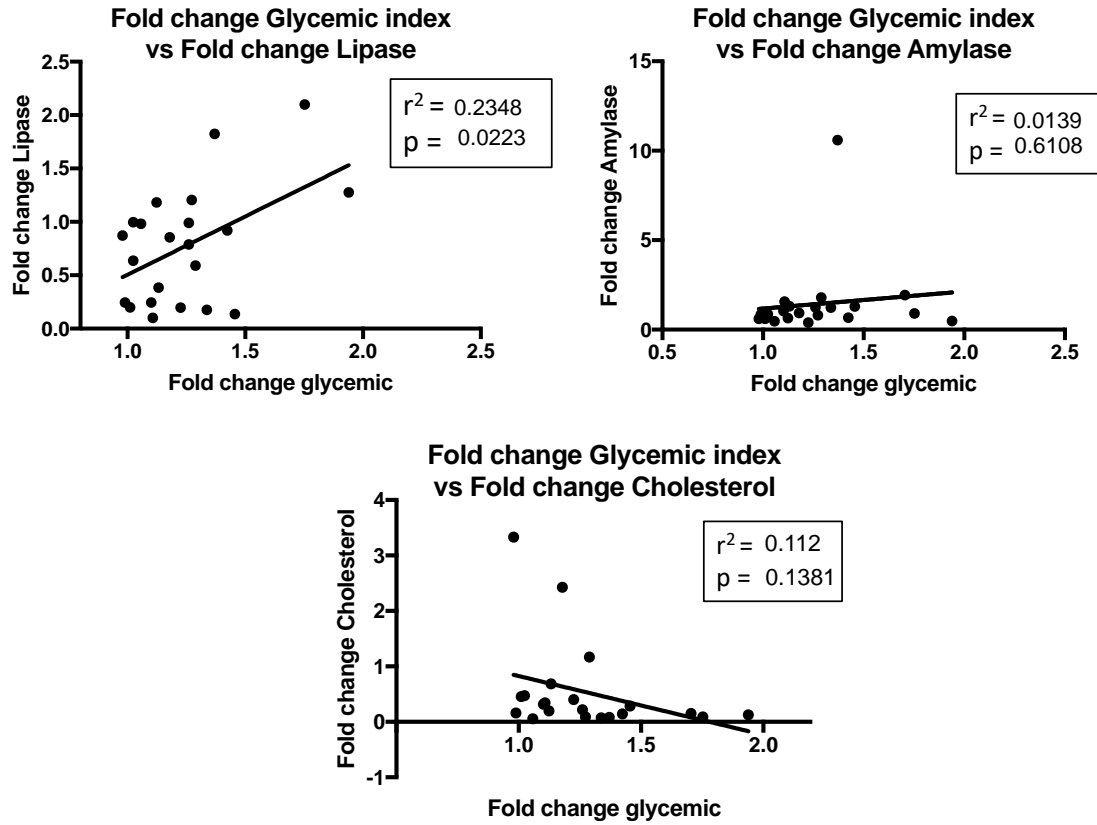


Suppl. Figure 2 : Microbiote des deux groupes de PRG comparé au groupe témoin

- A) Cladogrammes (LEfSe) des analyses effectuées « par paire » selon la méthode de Piphillin ont permis de prédire des voies métaboliques microbiennes dans la salive des trois groupes (PRG-B, PRF-F et CG).
- B) Histogramme du comptage des gènes des voies métaboliques microbiennes identifiées par des lettres isolées dans le cladogramme (Données indiquées avec un moyen +/- erreur standard moyenne ; *P<0,05, **P< 0,01 ; *** P<0,001 ; ****P< 0,0001, test non-apparié de Mann-Whitney et score LDA de 2,0 pour les cladogrammes).



Suppl. Figure 3: Corrélation linéaire entre le changement glycémique et le changement de pourcentage bactérien.



Suppl. Figure 4 : Corrélation linéaire entre le changement glycémique et le changement de certaines enzymes de la salive.

9 BIBLIOGRAPHIE

1. **Pascale A, Marchesi N, Marelli C, Coppola A, Luzi L, Govoni S, Giustina A, Gazzaruso C.** Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*. Septembre 2018, Vol. 61, 3, pp. 357-371.
2. **Wei S, Bahl MI, Baunwall SMD, Hvas CL, Licht TR.** Determining Gut Microbial Dysbiosis - A review of applied indexes for assessment of intestinal microbiota imbalances. *Appl Environ Microbiol*. Mars 2021, Vol. 19.
3. **Wheeler, W. Morton.** *The Ants of the Alaska*. Harvard : Bulletin of the Museum of Comparative Biology at Harvard College, 1917. Vol. LXI (61).
4. **Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, Codagnone MG, Hyland N,.** The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev* . . Oct 2019 , Vol. 99, 4, pp. 1877-2013.
5. **Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Hein R, Schimdt TM, Kamada N,.** The Bacterial Connection between the Oral Cavity and the Gut diseases. *J Dent Res*. Aug 2020, Vol. 99, 9, pp. 1021-1029.
6. **Verma D, Garg PK, Dubey AK.** Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol* . . May 2018 , Vol. 200, 4, pp. 525-540.
7. **Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Champomier Vergès MC, Charles T, Chen X, Cocolin L, Eversole K, Corral GH et al.** Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020, Vol. 8, p. 103.
8. **Sender R, Shai Fuchs S, Milo R,.** Revised Estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLOS Biology*. Vol. 14.
9. **Cossart, P.** *La Nouvelle Microbiologie : Des microbiotes aux CRISPR*. s.l. : Editions Odile Jacob.
10. **Lederberg J, McCray.** 'Omesweet 'omics: a genealogical treasury of Words. *Scientis*. 2001, Vol. 15, p. 8.
11. **Minty M, Loubières P, Canceill T, Azalbert V, Burcelin R, Tercé F, Blasco-Baque V.** Gender-associated differences in oral microbiota and salivary biochemical parameters in response to feeding. *J Physiol Biochem*. Jul 2020, Vol. 10, p. 1007.
12. **Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E.** The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J* . . Nov 2016, Vol. 221, 10, pp. 657-666.
13. **Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ.** The Human Microbiome and Child Growth - First 1000 Days and Beyond. *Trends Microbiol* . . Sep 2019 , Vol. 27, 2, pp. 131-147.
14. **Vuong HE, Pronovost GN, Williams DW, Coley EJJ, Siegler EL, Qiu A, Kazantsev M, Wilson CJ, Rendon T, Hsiao EY.** The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice. *Nature*. Oct 2020, Vol. 586, 7828, pp. 281-286.
15. **Sulyanto RM, Thompson ZA, Beall CJ, Leys EJ, Griffen AL.** The Predominant Oral Microbiota Is Acquired Early in an Organized Pattern. *Sci Rep* . . Jul 2019, Vol. 9, 1, p. 10550.

16. **Ren W, Zhang Q, Liu X, Zheng S, Ma L, Chen F, Xu T, Xu B.** Exploring the oral microflora of preschool children. *J. Microbiol.* Jul 2017, Vol. 55, 7, pp. 531-537.
17. **Serino M, Nicolas S, Trabelsi M S, Burcelin R, Blasco-Baque V,.** Young microbes for adult obesity. *Pediatr Obes.* Aug 2017, Vol. 12, 4, pp. 28-32.
18. **Rosan B, Lamont RJ.** Dental plaque formation. *Microbes Infect.* Nov 2000, Vol. 2, 13, pp. 1599-1607.
19. **Ten Cate JM.** Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology.* Sep 2006, Vol. 94, 1, pp. 1-9.
20. **Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr.** Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* Feb 1998, Vol. 25, 2, pp. 134-144.
21. **Lovegrove JM.** Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. *J N Z Soc Periodontol.* 2004, Vol. 87, pp. 7-21.
22. **Olsen I, Yamazaki K.** Can oral bacteria affect the microbiome of the gut? *J Oral Microbiol.* Mar 2019, Vol. 11, 1, p. 1586422.
23. **Larsen T, Fiehn NE,.** Dental biofilm infections - an update. *APMIS.* Apr 2017, Vol. 125, 4, pp. 376-384.
24. **Bellair, Marie.** *La Flore bactérienne dans la parodontite et la péri-implantite, similitudes et différences. revue de la littérature.* Unité de formation et de recherche d'odontologie, Université de Nantes. Nantes : s.n., 2015. pp. 1-115, Thèse pour le Diplôme d'Etat de docteur en Chirurgie Dentaire.
25. **Mohangi GU, Singh-Rambirich S, Volchansky A.** Periodontal disease: Mechanisms of infection and inflammation and possible impact on miscellaneous systemic diseases and conditions. *SADJ.* Nov 2013, Vol. 68, 10, pp. 462, 464-467.
26. **Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA.** *Carranza's clinical periodontology.* [éd.] Missouri : Elsevier Saunders St. Louis. 2015. Vol. 12.
27. **Nanci A, Bosshardt DD.** Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000.* 2006, Vol. 40, pp. 11-28.
28. **Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G.** Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000.* fev 2015, Vol. 67, 1, pp. 211-233.
29. **De Jong T, Bakker AD, V. Everts V, Smit TH.** The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration ». *J. Periodontal Res.* Déc 2017, Vol. 52, 6, pp. 965-974.
30. **Minty M, Canceil T, Serino M, Burcelin R, Tercé F, Blasco-Baque V.** Oral microbiota-induced periodontitis: a new risk factor of metabolic diseases. *Rev Endocr Metab Disord.* Dec 2019, Vol. 20, 4, pp. 449-459.
31. **Dahlen G, Basic A, Bylund J,.** Importance of Virulence Factors for the Persistence of Oral Bacteria in the Inflamed Gingival Crevice and in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J Clin Med.* Aug 2019, Vol. 8, 9, p. 1339.

32. **Papapanou PN, et al.** Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018, Vol. 89, Suppl 1, pp. S173-S182.
33. **Aaron SL, DeBlois KW,.** *Acute Necrotizing Ulcerative Gingivitis* . s.l. : Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; , 2021. p. Affiliations expand PMID: 32965914 Bookshelf ID: NBK562243.
34. **Sanz M, Del Castillo AM, et al,.** Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol* . . Mar 2020, Vol. 47, 3, pp. 268-288.
35. **Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN,.** Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. Juin 2017, Vol. 3, p. 17038.
36. **Petersen PE, Ogawa H.** The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*. Oct 2012 , Vol. 60, 1, pp. 15-39.
37. **Jiwei Sun, Qingming Tang, Shaoling Yu, Mengru Xie, Yanling Xie, Guangjin Chen, Lili Chen.** Role of the oral microbiota in cancer evolution and progression . *Jiwei Sun, Qingming Tang, Shaoling Yu, Mengru Xie, Yanling Xie, Guangjin Chen, Lili Chen Cancer Med*. 2020 Sep; 9(17): 6306–6321. .
38. **Baghbani T, Nikzad H, Azadbakht J, Izadpanah F, Kashani HH,.** Dual and mutual interaction between microbiota and viral infections: a possible treat for COVID-19. *Microb Cell Fact*. 2020, Vol. 19, p. 217.
39. **Humphrey SP, Williamson RT,.** A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. Feb 2001, Vol. 85, 2, pp. 162-169.
40. **Sas R, Dawes C,.** The intra-oral distribution of unstimulated and chewing-gum-stimulated parotid saliva. *Arch Oral Biol* . Jul 1997, Vol. 42, 7, pp. 469-474.
41. **Marsh P D, Do T, Beighton D, Devine D A,.** Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontol 2000* . Feb 2016, Vol. 70, 1, pp. 80-92.
42. **Hand AR, Pathmanathan D, Field RB,.** Morphological features of the minor salivary glands. *Arch Oral Biol*. May 1999 , Vol. 44, Suppl 1, pp. S3-S10.
43. **Proctor GB.** The physiology of salivary secretion. *Periodontol 2000* . . Feb 2016 Feb, Vol. 70, 1, pp. 11-25.
44. **Cossu M, Lantini MS,.** Ultrastructural localization of blood group antigens in human salivary glands. *Morphol*. Aug 1996, Vol. 34, 3, pp. 191-195.
45. **Epstein JB, Gorsky M, Guglietta A, Le N, Sonis ST.** The correlation between epidermaThe correlation between epidermal growth factor levels in saliva and the severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. , 2000, 89, II, 2258-2265. *Cancer*. 2000, Vol. 89, pp. 2258-2265.
46. **Langley, J. N.** On the Changes in Serous Glands during Secretion. *The Journal of Physiology*. 1879, Vol. 2, pp. 261–322.
47. **Edgar, WM.** Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J*. 1992, Vol. Apr 25;172(8):305-12.

48. **Kaplan I, Zuk-Paz L, Wolff A,**. Association between salivary flow rates, oral symptoms, and oral mucosal status. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod.* Aug 2008, Vol. 106, 2, pp. 235-241.
49. **Brosky ME.** The role of saliva in oral health: strategies for prevention and management of xerostomia. *J Support Oncol.* May 2007, Vol. 5, 5, pp. 215-225.
50. **Culp DJ, Richardson LA.** Regulation of mucous acinar exocrine secretion with age . *J Dent Res .* . Jan 1996, Vol. 75, 1, pp. 575-580.
51. **Singh H, Torralba MG, Moncera KJ, DiLello L, Petrini J, Nelson KE, Pieper R.** Gastro-intestinal and oral microbiome signatures associated with healthy aging. *Geroscience.* Dec 2019 , Vol. 41, 6, pp. 907-921.
52. **Takeshita T, et al.** Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Sci Rep .* 2016, Vol. 6, p. 22164.
53. **Yamashita Y, Takeshita T,.** The oral microbiome and human health. *J Oral Sci . .* 2017, Vol. 59, 2, pp. 201-206.
54. **Wang X, Du L, You J, King JB, Cichewicz RH,.** Fungal biofilm inhibitors from a human oral microbiome-derived bacterium. *Org Biomol Chem .* Mar 2012 , Vol. 10, 10, pp. 2044-2050.
55. **Wang J, Gao Y, Zhao F,.** Phage-bacteria interaction network in human oral microbiome. *Environ Microbiol .* Jul 2016 , Vol. 18, 7, pp. 2143-58.
56. **Bao L, Zhang C, Dong J, Zhao L, Li Y, Sun J,.** Oral Microbiome and SARS-CoV-2: Beware of Lung Co-infection. *Front Microbiol .* Jul 2020 , Vol. 11, p. 1840.
57. **Belstrøm D.** The salivary microbiota in health and disease. *Oral Microbiol .* Feb 2020, Vol. 12, 1, p. 1723975.
58. **Goodson JM, Hartman ML, Shi P, Hasturk H, Yaskell T, Vargas J, Song X, Cugini M, Barake R, Alsmadi O, Al-Mutawa S, Ariga J, Soparkar P, Behbehani J, Behbehani K.** The salivary microbiome is altered in the presence of a high salivary glucose concentration. *PLoS One.* Mar 2017, Vol. 12, 3, p. e0170437.
59. **Wang RR, et al.** Association of the oral microbiome with the progression of impaired fasting glucose in a Chinese elderly population. *J Oral Microbiol . .* Apr 2019, Vol. 11, 1, p. 1605789.
60. **Saeb ATM, Al-Rubeaan KA, Aldosary K, et al.** Relative reduction of biological and phylogenetic diversity of the oral microbiota of diabetes and pre-diabetes patients. *Microb Pathog . .* Mar 2019, Vol. 128, pp. 215-229.
61. **Lee LT, Wong YK, Hsia HY, Wang YW, Chan MY, Chang KW,.** Evaluation of saliva and plasma cytokine biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg .* Jun 2018 , Vol. 47, 6, pp. 699-707.
62. **Zhang S, Wu X, Diao P, Wang C, Wang D, Li S, Wang Y, Cheng J,.** Identification of a prognostic alternative splicing signature in oral squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol . .* May 2020, Vol. 235, 5, pp. 4804-4813.
63. **Zhang X, et al,.** The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med . .* Aug 2015, Vol. 21, 8, pp. 895-905.

64. **Herrera, JL, Lyons, MF, Johnson, LF.** Saliva: its role in health and disease. Oct;10(5):569-78. *J Clin Gastroenterol.* 10 Oct 1988, pp. 569-78.
65. **Devoize L, Dallel R.** *Salivation.* Paris : EMC (Elsevier Masson SAS), 2010. Vol. Médecine buccale, 28-150-M-10.
66. **Edgar WM.** Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J.* . Aug 1990 , Vol. 169, 3-4, pp. 96-98.
67. **Mandel ID.** The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc.* 1989, Vol. 119, pp. 298-304.
68. **Edgar WM, Higham SM, Manning RH,.** Saliva stimulation and caries prevention. . *Adv Dent Res.* Jul 1994 , Vol. 8, 2, pp. 239-245.
69. **Dashper SG, Pan Y, Veith PD, Chen YY, Toh ECY, Liu SW, Cross KJ, Reynolds EC,.** Lactoferrin inhibits Porphyromonas gingivalis proteinases and has sustained biofilm inhibitory activity. *Antimicrob Agents Chemother.* . Mar 2012, Vol. 56, 3, pp. 1548-1556.
70. **Velusamy SK, Fine DH, Velliyagounder K.** Prophylactic effect of human lactoferrin against Streptococcus mutans bacteremia in lactoferrin knockout mice. *Microbes Infect.* . Sep 2014 , Vol. 16, 9, pp. 762-767.
71. **Eliasson L, Carlén A,.** An update on minor salivary gland secretions. *Eur J Oral Sci.* Oct 2010, Vol. 118, 5, pp. 435-442.
72. **Meyle J, Chapple I.** Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* . Oct 2015 , Vol. 69, 1, pp. 7-17.
73. **Arneith B, Arneith R, Shams M,.** Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.* May 2019 , Vol. 20, 10, p. 2467.
74. **Kolb H, Martin S,.** Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med.* . Jul 2017 , Vol. 15, 1, p. 131.
75. **Passa P.** [How many diabetic patients are there in France?]. *Diabetes Metab.* Sep 1999 , Vol. 25, 4, pp. 366-367.
76. **Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, et al.** Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* Jul 2007, Vol. 56, 7, pp. 1761-1772.
77. **Prentki M, Nolan CJ,.** Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* . JUL 2006, Vol. 116, 7, pp. 1802-1812.
78. **Froguel P.** Glucokinase and MODY: from the gene to the disease. *Diabet Med.* 1996 Sep;13(9 Suppl 6):S96-7. Sep 1996, Vol. 13, 9 suppl 6, pp. S 96-97.
79. **Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R,.** Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes.* Dec 2002, Vol. 51, Suppl 3, pp. S405-413.
80. **Cusi K.** Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology.* Apr 2012 , Vol. 142, 4, pp. 711-725.

81. **Gorden P, Zadeh ES, Cochran E, Brown RJ.** Syndromic insulin resistance: models for the therapeutic basis of the metabolic syndrome and other targets of insulin resistance. *Endocr Pract* . . Sep - Oct 2012, Vol. 18, 5, pp. 763-771.
82. **Hosoi T, Yokoyama S, Matsuo S, Akira S, Ozawa K.** Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-deficiency increases risk of diabetes in mice . *PLoS One* . . Sep 2010, Vol. 5, 9, p. e12537.
83. **Khan AH, Pessin JE.** Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* . Nov 2002, Vol. 45, 11.
84. **Kolb H, Eizirik DL.** Resistance to type 2 diabetes mellitus: a matter of hormesis? *Nat Rev Endocrinol*. Oct 2011 , Vol. 8, 3, pp. 183-192.
85. **Burcelin R, Serino M, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J.** Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol*. 2011, Vol. 48, pp. 257-273.
86. **Klip A, McGraw TE, James DE.** Thirty sweet years of GLUT4. *J Biol Chem*. . Jul 2019 , Vol. 294, 30, pp. 11369-11381.
87. **Hotamisligil G S.** Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. Dec 2006, Vol. 444, 7121, pp. 860-867.
88. **Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB.** Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* . Jul 2006 , Vol. 116, 7, pp. 1793-1801.
89. **Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashi H, et al.** CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* . . Aug 2009 , Vol. 15, 8, pp. 914-920.
90. **Orr JS, Puglisi MJ, Ellacott KLJ, Lumeng CN, Wasserman DH, Hasty AH.** Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. *Diabetes*. Nov 2012, Vol. 61, 11, pp. 2718-2727.
91. **Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM.** M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol* . . Jun 2000, Vol. 164, 12, pp. 6166-6173.
92. **Benoit M, Desnues B, Mege JL.** Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* . . Sep 2008 , Vol. 181, 6, pp. 3733-3739.
93. **Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR.** Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* . . Jan 2007 , Vol. 117, 1, pp. 175-184.
94. **Gordon S.** Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* . Jan 2003, Vol. 3, 1, pp. 23-35.
95. **Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR.** T-ing up inflammation in fat. *Nat Med* . . Aug 2009, Vol. 15, 8, pp. 846-847.
96. **Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, Stephens JM, Mynatt RL, Dixit VD.** Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol* . . Aug 2010 , Vol. 185, 3, pp. 1836-1845.
97. **Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson MG, Alonso MN, Leong HX, Glassford A, Caimol M, Kenkel JA, Tedder TF, McLaughlin T, Miklos**

- DB, Dosch HM,**. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* . . May 2011 , Vol. 17, 5, pp. 610-617.
98. **Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD.** Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *Br J Nutr* . . Jan 2013 , Vol. 109, Suppl 2, pp. S81-85.
99. **Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI.** Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* . Aug 2005, Vol. 102, 31, pp. 11070-11075.
100. **Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI.** The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*. Nov 2009 , Vol. 1, 6, p. 6ra14.
101. **Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI.** Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. Apr 2008 , Vol. 3, 4, pp. 213-223.
102. **Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, Chamontin B, Ferrières J.** Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*. May 2008 , Vol. 87, 5, pp. 1219-1223.
103. **Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R.** Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)*. Jul 2008, Vol. 56, 5, pp. 305-309.
104. **Feghali CA, Wright TM,**. *Front Biosci* . *Cytokines in acute and chronic inflammation*. Jan 1997 Jan 1;2:d12-26. doi: 10.2741/a171., Vol. 2, pp. d12-26.
105. **Chauhan D, Walle LV, Lamkanfi M,**. Therapeutic modulation of inflammasome pathways. *Immunol Rev*. Sep 2020 , Vol. 297, 1, pp. 123-138.
106. **Zindel J, Kubes P,**. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol*. Jan 2020 , Vol. 15, pp. 493-518.
107. **Herwald H, Egesten A,**. On PAMPs and DAMPs. *J Innate Immun*. Aug 2016, Vol. 8, 5, pp. 427-428.
108. **Margină D, Ungurianu A, Purdel C, Tsoukal D, et al.** Chronic Inflammation in the Context of Everyday Life: Dietary Changes as Mitigating Factors. *Int J Environ Res Public Health* . . Jun 2020, Vol. 17, 11, p. 4135.
109. **Sies H, Jones DP,**. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jul 2020 , Vol. 21, 7, pp. 363-383.
110. **Bennett M, Gilroy DW,**. Lipid Mediators in Inflammation. *Review Microbiol Spectr*. Nov 2016 , Vol. 4, 6.
111. **Xiao E, Mattos M, Graves DT, et al.** Diabetes Enhances IL-17 Expression and Alters the Oral Microbiome to Increase Its Pathogenicity. *Cell Host Microbe*. Jul 2017, Vol. 22, 1, pp. 120 - 128.
112. **Matsha TE, Prince Y, Davids S, Chikte U, Erasmus RT, Kengne AP,**. Oral Microbiome Signatures in Diabetes Mellitus and Periodontal Disease . *J Dent Res* . Jun 2020 , Vol. 99, 6, pp. 658-665.
113. **Graves DT, Ding Z, Yang Y,**. The impact of diabetes on periodontal diseases. *Periodontol 2000*. Feb 2020, Vol. 82, 1, pp. 214-224.

114. **Almeida-Santos A, Martins-Mendes D, Gayà-Vidal M, Pérez-Pardal L, Beja-Pereira A.** Characterization of the Oral Microbiome of Medicated Type-2 Diabetes Patients. *Front Microbiol.* Feb 2021 , Vol. 12, p. e610370.
115. **Sharma N, Bhatia S, Sodhi AS, Batra N.** Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol.* Jan 2018 , Vol. 4, 1, pp. 42-66.
116. **Joshi K, Muñoz-Torre F, Fernández-Santiago J, Patel RP, Lopez-Candales A.** Over-the-counter mouthwash use, nitric oxide and hypertension risk . *Blood Press* . Apr 2020, Vol. 29, 2, pp. 103-112.
117. **Needleman I, et al.** Oral health and impact on performance of athletes participating in the London 2012 Olympic Games: a cross-sectional study. *Br J Sports Med.* 2013, Vol. 47, pp. 1054-1058.
118. **Needleman I, et al.** Oral health and elite sport performance. *Br J Sports Med.* Jan 2015, Vol. 49, 1, pp. 3-6.
119. **Kroon J, Cox J A, Knight J E, Nevins P N, Kong W W.** Mouthguard Use and Awareness of Junior Rugby League Players in the Gold Coast, Australia: A Need for More Education. *Clin J Sport Med.* 2016, Vol. 26, pp. 128-132.
120. **Ashley P, Di Iorio A, Cole E, Tanday A, Needleman I.** Oral health of elite athletes and association with performance: a systematic review.. *Br J Sports Med.* 2015, Vol. 49, pp. 14-19.
121. **Schildknecht S, Krastl G, Kuhl S, Filippi A.** Dental injury and its prevention in Swiss rugby. *Dent Traumatol* . 2012, Vol. 28, pp. 465-469.
122. **Ilija E, Metcalfe K, Heffernan M.** Prevalence of dental trauma and use of mouthguards in rugby union players. *Aust Dent J* . 2014, Vol. 59, pp. 473-481.
123. **Abdullah D, Liew AK, Wan Noorina W A, Khoo S, Wee F C.** Association of dental trauma experience and first-aid knowledge among rugby players in Malaysia. *Dent Traumatol* . 2015, Vol. 31, pp. 403-408.
124. **Boffano P, et al.** Rugby athletes' awareness and compliance in the use of mouthguards in the North West of Italy. *Dent Traumatol* . 2012, Vol. 28, pp. 201-213.
125. **Tanaka Y, et al.** Prevention of orofacial injury via the use of mouthguards among young male rugby players. *Int J Sports Med* . 2015, Vol. 36, pp. 254-261.
126. **Nieman D C.** Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on systemic immunity. *Immunol Cell Biol.* 2000, Vol. 78, pp. 496-501.
127. **Pedersen B K, Toft A D.** Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med* . 2000, Vol. 34, pp. 246-251.
128. **Pedersen B K, et al.** Cytokines in aging and exercise. *Int J Sports Med* . 2000, Vol. 21, 1, pp. 4-9.
129. **Blasco-Baque V, et al.** Periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut* . 2017, Vol. 66, pp. 872-885.
130. **Valdez RMA, Duque C, Caiaffa KS, Dos Santos VR, Loesch MLA, Colombo NH, Arthur RA, Negrini TC, Boriollo MFG, Delbem ACB.** Genotypic diversity and phenotypic traits of

- Streptococcus mutans isolates and their relation to severity of early childhood caries. *BMC Oral Health*. 2017, Vol. 17, p. 115.
131. **Serino M, Blasco-Baque V, Burcelin R,** Microbes on-air: gut and tissue microbiota as targets in type 2 diabetes. *J Clin Gastroenterol*. 2012, Vol. 46 Suppl., pp. S27-28.
132. **Von Elm E, et al.** The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *PLoS Med*. 2007, Vol. 4, p. 296.
133. **Noh H, et al.** Identification of Urinary Polyphenol Metabolite Patterns Associated with Polyphenol-Rich Food Intake in Adults from Four European Countries. *Nutrients*. 25 Jul 2017, Vol. 9, 8, p. 796.
134. **Lesage F X, Berjot S, Deschamps F,** Clinical stress assessment using a visual analogue scale. *Occup Med (Lond)* . 2012, Vol. 62, pp. 600-605.
135. **Organization, World Health.** *Oral health surveys: basic methods*. s.l. : School of Dentistry, University of Sao Paulo, 2013. p. 125. Vol. 5 th Edition.
136. **Petersen Poul Erik, Baez Ramon J,** Oral health surveys: basic methods – 5th ed. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data* . 2013, Vol. 5th ed, pp. 1-123.
137. **Holde G E, Oscarson N, Trovik T A, Tillberg A, Jonsson B,** Periodontitis Prevalence and Severity in Adults: A Cross-Sectional Study in Norwegian Circumpolar Communities. *J Periodontol* . Oct 2017, Vol. 88, 10, pp. 1012-1022.
138. **Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter J P, Pineill J L, Sixou M,** Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* . 2005, Vol. 20, pp. 244-252.
139. **Holt J G, et al.** Bergey's Manual of Determinate Bacteriology. 9th, 1994, p. 787.
140. **Chan E C, McLaughlin R,** Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* . 2000, Vol. 15, pp. 1-9.
141. **Segata N, et al.** Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* . . Jun 2011, Vol. 12, 6, p. R60.
142. **Iwai S, et al.** Piphillin: Improved Prediction of Metagenomic Content by Direct Inference from Human Microbiomes. *PLoS One* . 2016, Vol. 11, p. 11.
143. **Ogata H, et al.** KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*. January 1999, Vol. 27, 1, pp. 29-34.
144. **Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu C Y,** Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontol 2000*. 2016, Vol. 70, pp. 128-141.
145. **Needleman I, et al.** Infographic : oral health in elite athletes. *Br J Sports Med*. May 2017, Vol. 51, 9, p. 757.
146. **Barton W, et al.** The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. *Gut*. 2017, Vol. 10, p. 1136.
147. **Krishnan K, Chen T, Paster BJ.** A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis*. Apr 2017 , Vol. 23, 3, pp. 276-286.

148. **Agnello M, et al.** Microbiome Associated with Severe Caries in Canadian First Nations Children. *J Dent Res*. Nov 2017, Vol. 96, 12, pp. 1378-1385.
149. **Branchereau M, et al.** Periodontal dysbiosis linked to periodontitis is associated with cardiometabolic adaptation to high-fat diet in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* . Jun 2016, Vol. 310, 11, pp. 1091-1101.
150. **Magennis E P, et al.** Polymers for binding of the gram-positive oral pathogen *Streptococcus mutans*. *PLoS One*. Jul 2017, Vol. 12, 7.
151. **Hojo S, Komatsu M, Okuda R, Takahashi N, Yamada T.** Acid profiles and pH of carious dentin in active and arrested lesions. *J Dent Res* . Dec 1994, Vol. 73, 12, pp. 1853-1857.
152. **Bryant S, McLaughlin K, Morgaine K, Drummond B,.** Elite athletes and oral health. *Int J Sports Med* . 2011, Vol. 32, pp. 720-724.
153. **Zero D T, et al.** Clinical practice guidelines for oral management of Sjogren disease: Dental caries prevention. *J Am Dent Assoc* . 2016, Vol. 147, pp. 295-305.
154. **Rodriguez G, et al.** Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial. *J Dent Res* . 2016, Vol. 95, pp. 402-407.
155. **Pedersen A, Sorensen CE, Proctor GB, Carpenter GH.** Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. *Oral Dis*. Nov 2018, Vol. 24, 8, pp. 1399-1416.
156. **Drazewski D, Grzymislawska M, Korybalska K, Czepulis N, Grzymislawski M, Witowski J, Surdacka A.** (2017) Oral Health Status of Patients with Lysosomal Storage Diseases in Poland. *Int J Environ Res Public Health* . Mars 2017, Vol. 14, 3, p. 281.
157. **Kahrstrom CT, Pariente N, Weiss U.** Intestinal microbiota in health and disease. *Nature* . Jul 2016, Vol. 535, 7610, p. 47.
158. **Bollero P, Di Renzo L, Franco R, Rampello T, Pujia A, Merra G, De Lorenzo A, Docimo R.** Effects of new probiotic mouthwash in patients with diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. Dec 2017, Vol. 21, 24, pp. 5827-5836.
159. **Madonna R, Balistreri CR, De Rosa S, Muscoli S, Selvaggio S, Selvaggio G, Ferdinandy P, De Caterina R.** Impact of Sex Differences and Diabetes on Coronary Atherosclerosis and Ischemic Heart Disease. *J Clin Med* . Jan 2019, Vol. 8, 1, p. 98.
160. **Hodes GE, Epperson CN.** Sex Differences in Vulnerability and Resilience to Stress Across the Life Span. *Biol Psychiatry*. Sep 2019, Vol. 86, 6, pp. 421-432.
161. **Snell DM, Turner JMA** . Sex Chromosome Effects on Male-Female Differences in Mammals. *Curr Biol* . Nov 2018, Vol. 28, 22, pp. 1313-1324.
162. **Beale AL, Kaye DM, Marques FZ.** The role of the gut microbiome in sex differences in arterial pressure. *Biol Sex Differ* . Apr 2019, Vol. 10, 1, p. 22.
163. **Huebschmann AG, Huxley RR, Kohrt WM, Zeitler P, Regensteiner JG, Reusch JEB.** Sex differences in the burden of type 2 diabetes and cardiovascular risk across the life course. *Diabetologia*. Oct 2019, Vol. 62, 10, pp. 1762-1772.
164. **Ortiz S, Herrman E, Lyashenko C, Purcell A, Raslan K, Khor B, Snow M, Forsyth A, Choi D, Maier T, Machida CA.** Sex-specific differences in the salivary microbiome of caries-active children. *J Oral Microbiol* . Aug 2019, Vol. 11, 1, p. 1653124.

165. **Vari R, Scazzocchio B, D'Amore A, Giovannini C, Gessani S, Masella R.** Gender-related differences in lifestyle may affect health status. *Ann Ist Super Sanita* . Apr-Jun 2016, Vol. 52, 2, pp. 158-166.
166. **Clegg DJ, Mauvais-Jarvis F.** An integrated view of sex differences in metabolic physiology and disease. *Mol Metab* . Sep 2018, Vol. 15, pp. 1-2.
167. **Redekop WK, Mladsi D.** The faces of personalized medicine: a framework for understanding its meaning and scope. *Value Health*. Sep-Oct 2013, Vol. 16, 6, pp. 4-9.
168. **Zaura E, et al.** Same Exposure but Two Radically Different Responses to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome versus Long-Term Microbial Shifts in Feces. *mBio*. Nov 2015, Vol. 6, 6, pp. e01693-1715.
169. **Ansari-Pour N, Jafari M,.** Why, When and How to Adjust Your P Values? *Cell J* . Jan 2019, Vol. 20, 4, pp. 604-607.
170. **Post, Marcel W M.** Definitions of Quality of Life: What Has Happened and How to Move On. *Top Spinal Cord Inj Rehabil*. 2014, Vol. 20, 3, pp. 167-180.
171. **Minty M, Burcelin R, Diemer F, Blasco-Baque V, et al.** Oral health and microbiota status in professional rugby players: A case-control study. *J Dent*. Dec 2018, Vol. 79, pp. 53-60.
172. **Escudié F, et al.** FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* . Apr 2018, Vol. 34, 8, pp. 1287-1294.
173. **Jafari M, et al.** Why, When and How to Adjust Your P Values? *Cell J* . . Jan 2019, Vol. 20, 4, pp. 604-607.
174. **Palmerini CA, Saccardi C, Ferracci F, Arienti S.** Lipid patterns in the saliva of smoking young adults. *Hum Exp Toxicol* . Oct 2011, Vol. 30, 10, pp. 1482-1488.
175. **Karjalainen S, et al.** Salivary cholesterol of healthy adults in relation to serum cholesterol concentration and oral health. *J Dent Res* . . Oct 1997, Vol. 76, 10, pp. 1637-1643.
176. **Hamosh M, Ganot D, Hamosh P,.** Rat lingual lipase. Characteristics of enzyme activity. *J Biol Chem*. Dec 1979, Vol. 254, 23, pp. 12121-12125.
177. **Hamosh M, Scow RO.** Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *J Clin Invest* . Jan 1973, Vol. 52, 1, pp. 88-95.
178. **Voigt N, Stein J, Galindo MM, Dunkel A, et al.** The role of lipolysis in human orosensory fat perception . *J Lipid Res*. May 2014, Vol. 55, 5, pp. 870-882.
179. **Robinson DS, Speake BK.** Role of insulin and other hormones in the control of lipoprotein lipase activity. *Biochem Soc Trans* . Feb 1989, Vol. 17, 1, pp. 40-42.
180. **Morzel M, Truntzer C, et al.** Associations between food consumption patterns and saliva composition: Specificities of eating difficulties children. *Physiol Behav*. May 2017, Vol. 173, pp. 116-123.
181. **Subramaniam P, Sharma A, Kaje K.** Association of salivary triglycerides and cholesterol with dental caries in children with type 1 diabetes mellitus. *Spec Care Dentist* . *Spec Care Dentist* . May-Jun 2015, Vol. 35, 3, pp. 120-122.

182. **Ortiz S, et al.** Sex-specific differences in the salivary microbiome of caries-active children. *J Oral Microbiol.* Aug 2019, Vol. 11, 1, p. 1653124.
183. **De Toro-Martin J, Arsenault BJ, Despres JP, Vohl MC. et De Toro-Martin J.** Precision Nutrition: A Review of Personalized Nutritional Approaches for the Prevention and Management of Metabolic Syndrome. *Nutrients.* Aug 2017, Vol. 9, 8, p. 913.
184. **Bolei L, Yang G, et al.** Oral bacteria colonize and compete with gut microbiota in gnotobiotic mice. *Int J Oral Sci.* Mar 2019, Vol. 11, 1, p. 10.
185. **Nicolas S, Blasco-Baque V, Burcelin R, et al.** Transfer of dysbiotic gut microbiota has beneficial effects on host liver metabolism. *Mol Syst Biol.* Mar 2017, Vol. 13, 3, p. 921.
186. **Blasco-Baque V, Coupe B, Burcelin R, Serino M, et al.** Associations between hepatic miRNA expression, liver triacylglycerols and gut microbiota during metabolic adaptation to high-fat diet in mice. *Diabetologia.* Apr 2017, Vol. 60, 4, pp. 690-700.
187. **Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM.** Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetolog. Diabetologia.* Nov 2007, Vol. 50, 11, pp. 2374-2383.
188. **Villanueva-Millan MJ, Perez-Matute P, Oteo JA.** Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. *J Physiol Biochem.* Sep 2015, Vol. 71, 3, pp. 509-525.
189. **Thomas F, Hehemann J-H, Rebuffet E, Czjzek M, Gurvan M,.** Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Front Microbiol.* May 2011, Vol. 2, p. 93.
190. **Katagiri S, Shiba T, Tohara H, et al.** Re-initiation of Oral Food Intake Following Enteral Nutrition Alters Oral and Gut Microbiota Communities. *Front Cell Infect Microbiol.* Dec 2019, Vol. 9, p. 434.
191. **Jakubovics NS, Yassin SA, Rickard AH.** Community Interactions of Oral Streptococci. *Adv Appl Microbiol.* 2014, Vol. 87, pp. 43-110.
192. **Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA.** Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr.* Oct 2018, Vol. 6, 5, p. 10.
193. **Champagne C, Yoshinari N, Oetjen JA, Riché EL, Beck JD, Offenbacher S,.** Gender Differences in Systemic Inflammation and Atheroma Formation Following Porphyromonas Gingivalis Infection in Heterozygous Apolipoprotein E-deficient Mice. *J Periodontal Res* 44(. *J Periodontal Res.* Oct 2009, Vol. 44, 5, pp. 569-577.
194. **Leadbetter ER, Holt SC, Socransky SS,.** Capnocytophaga: New Genus of Gram-Negative Gliding Bacteria. I. General Characteristics, Taxonomic Considerations and Significance. *Arch Microbiol.* Jul 1979, Vol. 122, 1, pp. 9-16.
195. **Hamden K, Carreau S, Boujbiha MA, Lajmi S, Aloulou D, Kchaou D, Elfeki A,.** Hyperglycaemia, Stress Oxidant, Liver Dysfunction and Histological Changes in Diabetic Male Rat Pancreas and Liver: Protective Effect of 17 beta-estradiol. *Steroids.* May 2008, Vol. 73, 5, pp. 495-501.
196. **Vázquez-Martínez ER, Garcia-Gomez E, Camacho-Arroyo I, González-Pedrajo B, (.** Sexual Dimorphism in Bacterial Infections. *Biol Sex Differ.* Jun 2018, Vol. 9, 1, p. 27.

197. **Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DTW.** Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities. *Clin Microbiol Rev* . Oct 2013, Vol. 26, 4, pp. 781-791.
198. **Forouhi NG, Wareham NJ.** Epidemiology of diabetes. 2014, Vol. 43, pp. 698 - 702.
199. **Cani PD, Burcelin R, et al.** Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007, Vol. 56, pp. 1761 - 1772.
200. **Carneiro E, Parolin AB, Wichnieski C, Rosa EA, Silva Neto UX, Westphalen VP, Fariniuk LF, Johann AC.** Expression levels of the receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin and the number of gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *Arch Oral Biol*. Jan 2017, Vol. 73, pp. 166 - 171.
201. **Leite FRM, Peres KG, Do LG, Demarco FF, Peres MAA,.** Prediction of Periodontitis Occurrence: Influence of the Classification and Sociodemographic and General Health Information. *J Periodontol*. Aug 2017, Vol. 88, 8, pp. 731 - 743.
202. **Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R.** Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. Jan 2012, Vol. 55, 1, pp. 21 - 31.
203. **Lakschevitz F, Aboodi G, Tenenbaum H, Glogauer M.** Diabetes and periodontal diseases: interplay and links. *Curr Diabetes Rev*. Nov 2011, Vol. 7, 6, pp. 433 - 439.
204. **Kumar M, Mishra L, Mohanty R, Nayak R,.** Diabetes and gum disease: the diabolic duo. *Diabetes Metab Syndr*. Oct-Dec 2014, Vol. 8, 4, pp. 255 - 258.
205. **Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J.** Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014, Vol. 2014, p. 476068.
206. **Borrell L N, Kunzel C, Lamster I, Lalla E,.** Diabetes in the dental office: using NHANES III to estimate the probability of undiagnosed disease. *J Periodontal Res*. Dec 2007, Vol. 42, 6, pp. 559–565.
207. **Amano A.** Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by Porphyromonas gingivalis. *Front Biosci*. May 2007, Vol. 12, pp. 3965 - 3974.
208. **Fasano A.** Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev*. Jan 2011, Vol. 91, 1, pp. 151 - 175.
209. **McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL.** The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*. Apr 2019, Vol. 50, 4, pp. 892 - 906.
210. **Graves DT, Corrêa JD, Silva TA.** The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *J Dent Res*. Feb 2019, Vol. 98, 2, pp. 148 - 156.
211. **Pandiyan P, Hernandez-Santos N, et al.** CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse Candida albicans Th17 cell infection model. *Immunity*. Mar 2011, Vol. 34, 3, pp. 422 – 434.
212. **Dutzan N, Moutsopoulos NM, et al.** On-going mechanical damage from mastication drives homeostatic Th17 cell responses at the oral barrier. *Immunity*. Jan 2017, Vol. 46, 1, pp. 133 - 147.

213. **Dutzan N, Kajikawa T, et al.** A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Sci Trans Med*. Oct 2018, Vol. 10, 463, p. eaat0797.
214. **McAleer J P, Liu B, Li Z, Ngoi S M, Dai J, Oft M, Vella A T.** Potent intestinal Th17 priming through peripheral lipopolysaccharide-based immunization. *J Leukoc Biol*. Jul 2010, Vol. 88, 1, pp. 21-31.
215. **Cheng WC, van Asten SD, Taams LS, et al.** Periodontitis-associated pathogens *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* activate human CD14(+) monocytes leading to enhanced Th17/IL-17 responses. *Eur J Immunol*. Septembre 2016, Vol. 46, 9, pp. 2211 - 2221.
216. **Dunn, Olive J.** Confidence intervals for the means of dependent, normally distributed variables. *Journal of the American Statistical Association*. 1959, Vol. 54, 287, pp. 613-621.
217. **Amano A, Chen C, Honma K, Li C, Settem RP, Sharma A,.** Genetic Characteristics and Pathogenic Mechanisms of Periodontal Pathogens. *Adv Dent Res*. May 2014, Vol. 26, 1, pp. 15-22.
218. **Makiura N, Ojima M, Kou Y, Furuta N, Okahashi N, Shizukuishi S, Amano A. 2008,.** Relationship of *Porphyromonas gingivalis* with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol*. Aug 2008, Vol. 23, 4, pp. 348-351.
219. **Bhat U G, Ilievski V, Unterman T G, et Watanabe K,.** *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Upregulates Insulin Secretion From Pancreatic β Cell Line MIN6. *J. Periodontol*. Nov 2014, Vol. 85, 11, pp. 1629-1636.
220. **Luche E, Cousin B, Garidou L, Serino M, Burcelin R, et al.** Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism. Jul 2013, Vol. 2, 3, pp. 281-291.
221. **Gibson F C, Yumoto H, Takahashi Y, Chou H H, Genco C A,.** Innate immune signaling and *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis. *J. Dent Res*. Feb 2006, Vol. 85, 2, pp. 106-121.
222. **Yang X, Zhang J, Ni J, Ouyang B, Wang D, Luo S, Xie B, Xuan D.** Toll-like receptor 4-mediated hyper-responsiveness of gingival epithelial cells to lipopolysaccharide in high-glucose environments. *J. Periodontol*. Nov 2014, Vol. 85, 11, pp. 1620 – 1628.
223. **Pomié C, Garidou L, Burcelin R,.** Intestinal ROR γ t-generated Th17 cells control type 2 diabetes: A first antidiabetic target identified from the host to microbiota crosstalk. *Inflamm. Cell Signal*. 2016, Vol. 3, p. e1074.
224. **Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C.** A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. Nov 2005, Vol. 6, 11, pp. 1133-141.
225. **Han Y W, et Wang X.** Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res*. Jun 2013, Vol. 92, 6, pp. 485-491.
226. **Omura Y, et al.** Morbidly obese patient with non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis who died from sepsis caused by dental infection of *Porphyromonas gingivalis*: A case report. *Hepatol Res*. Mar 2016, Vol. 46, 3, pp. E210-215.
227. **Onishi R M, Gaffen S L.** Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. Mar 2010, Vol. 129, 3, pp. 311-321.

228. **Mobini R, Jansson PA et al.** Metabolic effects of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in people with type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab.* Apr 2017, Vol. 19, 4, pp. 579-589.
229. **Nair PN.** On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* Apr 2006, Vol. 39, 4, pp. 249-281.
230. **Ha NH, Park DG, Woo BH, Kim DJ, Choi JI, Park BS, Kim YD, Lee JH, Park HR.** *Porphyromonas gingivalis* increases the invasiveness of oral cancer cells by upregulating IL-8 and MMPs. *Cytokine.* Oct 2016, Vol. 86, pp. 64-72.
231. **Ha NH, Woo BH, Kim DJ, Ha ES, Choi JI, Kim SJ, Park BS, Lee JH, Park HR,.** Prolonged and repetitive exposure to *Porphyromonas gingivalis* increases aggressiveness of oral cancer cells by promoting acquisition of cancer stem cell properties. *Tumour Biol.* Dec 2015, Vol. 36, 12, pp. 9947-9960.
232. **Geng F, Liu J, Guo Y, Li C, Wang H, Wang H, Zhao H, Pan Y.** Persistent Exposure to *Porphyromonas gingivalis* Promotes Proliferative and Invasion Capabilities, and Tumorigenic Properties of Human Immortalized Oral Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* Feb 2017, Vol. 7, p. 57.
233. **Righetti RF, et al.** Protective Effects of Anti-IL17 on Acute Lung Injury Induced by LPS in Mice. *Front Pharmacol.* Oct 2018, Vol. 9, p. 1021.
234. **Li TJ, Zhao LL, Qiu J, Zhang HY, Bai GX, Chen L.** Interleukin-17 antagonist attenuates lung inflammation through inhibition of the ERK1/2 and NF- κ B pathway in LPS-induced acute lung injury. *Mol Med Rep.* Aug 2017, Vol. 16, 2, pp. 2225-2232.
235. **Rafael-Vidal C, Pérez N, Altabás I, Garcia S, Pego-Reigosa JM.** Blocking IL-17: A Promising Strategy in the Treatment of Systemic Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci.* . Sep 2020, Vol. 26, 19, p. 7100.
236. **Hohenberger M, Cardwell LA, Oussedik E, Feldman SR,.** Interleukin-17 inhibition: role in psoriasis and inflammatory bowel disease. . *J Dermatolog Treat.* Feb 2018, Vol. 29, 1, pp. 13-18.
237. **Canavan TN, Elmets CA, Cantrell WL, Evans JM, Elewski BE,.** Anti-IL-17 Medications Used in the Treatment of Plaque Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Comprehensive Review. *Am J Clin Dermatol.* Feb 2016, Vol. 17, 1, pp. 33-47.
238. **Kurschus FC, Moos S,.** IL-17 for therapy. *J Dermatol Sci.* Sep 2017, Vol. 87, 3, pp. 221-227.
239. **Alhasson F, et al.** Altered gut microbiome in a mouse model of Gulf War Illness causes neuroinflammation and intestinal injury via leaky gut and TLR4 activation. *PLoS One.* Mar 2017, Vol. 12, 3, p. e0172914.
240. **Sundar C, Ramalingam S, Mohan V, Pradeepa R, Ramakrishnan MJ.** Periodontal therapy as an adjunctive modality for HbA1c reduction in type-2 diabetic patients. *J Educ Health Promot.* . Dec 2018, Vol. 7, p. 152.
241. **Tsobgny-Tsague NF, Lontchi-Yimagou E, Nana ARN, Tankeu AT, Katte JC, Dehayem MY, Bengondo CM, Sobngwi E,.** Effects of nonsurgical periodontal treatment on glycated haemoglobin on type 2 diabetes patients (PARODIA 1 study): a randomized controlled trial in a sub-Saharan Africa population. *BMC Oral Health.* Feb 2018, Vol. 18, 1, p. 28.

242. **Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, Fukuda T, Tsuji T, Iwamoto M, Murayama Y.** The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol.* Jun 2001, Vol. 72, 6, pp. 774-778.
243. **Agarwal MC, Chaubey KK, Madan E, Agarwal S.** Effect of periodontal therapy on type 2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis with the evaluation of HbA1c. *Journal of International Clinical Dental Research Organization.* 2016, Vol. 8, 1, pp. 34-38.
244. **Rosier BT, Marsh PD, Mira A,.** Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J Dent Res.* Apr 2018, Vol. 97, 4, pp. 371-380.
245. **Fang D, Shi D, Lv L, Gu S, Wu, Chen Y, Guo J, Li A, Hu X, Guo F, Ye J, Li Y Li L.** Bifidobacterium pseudocatenulatum LI09 and Bifidobacterium catenulatum LI10 attenuate D-galactosamine-induced liver injury by modifying the gut microbiota. *Sci Rep.* Aug 2017, Vol. 7, 1, p. 8770.
246. **Schneeberger M, Everard A, Gómez-Valadés AG, Matamoros S, Ramírez S, Delzenne NM, Gomis R, Clare.** Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Sci Rep.* Nov 2015, Vol. 5, p. 16643.
247. **Moya-Pérez A, Neef A, Sanz Y.** Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS One.* Jul 2015, Vol. 10, 7, p. e0126976.
248. **Zalewska A, Waszkiewicz N, López-Pintor RM.** The Use of Saliva in the Diagnosis of Oral and Systemic Diseases. *Dis Markers.* Jun 2019 , Vol. 2019, p. 9149503.
249. **Mannoor MS, Tao H, Clayton JD, Sengupta A, Kaplan DL, Naik RR, Verma N, Omenetto FG, McAlpine MC.** Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. *Nat Commun .* Mar 2012, Vol. 3, p. 763.
250. **Wong D T.** Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer 'oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance. *Expert Rev Mol Diagn.* May 2006, Vol. 6, 3, pp. 267-272.
251. **Wang L, Wu Y, Zhuang L, Chen X, Min H, Song S, Liang Q, Li AD, Gao Q.** Puerarin prevents high-fat diet-induced obesity by enriching Akkermansia muciniphila in the gut microbiota of mice. *PLoS One.* Jun 2019, Vol. 14, 6, p. e0218490.
252. **Lee CJ, Iyer G, Liu Y, Kalyani RR, Bamba N, Ligon CB, Varma S, Mathioudakis N.** The effect of vitamin D supplementation on glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. *J Diabetes Complications.* Jul 2017, Vol. 31, 7, pp. 1115-1126.
253. **Sacerdote A, Dave P, Lokshin V, Bahtiyar G.** Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, and Vitamin D. *Curr Diab Rep.* . Sep 2019, Vol. 19, 10, p. 101.
254. **Issa, CM.** Vitamin D and Type 2 Diabetes Mellitus. *Adv Exp Med Biol.* 2017, Vol. 996, pp. 193-205.
255. **Lips P, Eekhoff M, van Schoor N, Oosterwerff M, de Jongh R, Krul-Poel Y, Simsek S.** Vitamin D and type 2 diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Oct 2017, Vol. 173, pp. 280-285.

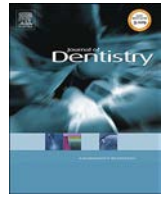
256. **Antonoglou GN, Knuuttila M, Niemelä O, Raunio T, Karttunen R, Vainio O, Hedberg P, Ylöstalo P, Tervonen T.** Low serum level of 1,25(OH)₂ D is associated with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* Apr 2015, Vol. 50, 2, pp. 274-280.
257. **Rhodes JM, Subramanian S, Laird E, Griffin G, Kenny RA.** Perspective: Vitamin D deficiency and COVID-19 severity - plausibly linked by latitude, ethnicity, impacts on cytokines, ACE2 and thrombosis. *J Intern Med.* . Jan 2021, Vol. 289, 1, pp. 97-115.
258. **Mangin M, Sinha R, Fincher K.** Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflamm Res.* . Oct 2014, Vol. 63, 10, pp. 803-819.
259. **Pilz S, Kienreich K, Rutters F, de Jongh R, van Ballegooijen AJ, Grübler M, Tomaschitz A, Dekker JM.** Role of vitamin D in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* Apr 2013 , Vol. 13, 2, pp. 261-270.
260. **Vlassoff C.** Gender differences in determinants and consequences of health and illness. *J Health Popul Nutr.* Mar 2007, Vol. 25, 1, pp. 47-61.

10 ANNEXES : LES TROIS ARTICLES PUBLIES



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Dentistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jdent

Oral health and microbiota status in professional rugby players: A case-control study

Matthieu Minty^{a,b,c,2}, Thibault Canceill^{b,c,1,2}, Sylvie Lê^{a,b,c,2}, Pauline Dubois^{b,c,2}, Oihana Amestoy^{b,c,2}, Pascale Loubieres^{a,b,c,2}, Jeffrey E. Christensen^{a,b,2}, Camille Champion^{a,b,d,2}, Vincent Azalbert^{a,b,2}, Estelle Grasset^{a,b,2}, Sara Hardy^{a,b,2}, Jean-Michel Loubes^{d,2}, Jean-Philippe Mallet^{a,b,2}, François Tercé^{a,b,2}, Jean-Noël Vergnes^{a,b,c,2}, Rémy Burcelin^{a,b,2}, Matteo Serino^{e,1,2}, Franck Diemer^{b,c,f,1,2}, Vincent Blasco-Baque^{a,b,c,*,2}

^a INSERM U1048, F-31432 Toulouse, France, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), F-31432 Toulouse, France

^b Université Paul Sabatier III (UPS), F-31432 Toulouse, France

^c CHU Toulouse, Service d'Odontologie Toulouse, F-3100, France

^d Institut de Mathématiques de Toulouse, Université de Toulouse, 118, route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

^e IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France

^f Clément Ader Institute, UMR-CNRS 5312, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Oral health
Microbiota
Athletes
Professional rugby players
Decays
Streptococcus

ABSTRACT

Objective: Elite athletes are prone to develop oral diseases, which could increase the risk for injuries. The aim of this study was to evaluate the oral health and the composition of oral microbiota of elite rugby players compared to the general population.

Methods: We set up a case-control study by screening 24 professional rugby players (PRG) and 22 control patients (CG) for dental and gingival examinations and performed a taxonomic analysis and a predicted functional analysis of oral microbiota.

Results: The Decay, Missing and Filled (DMF) teeth index (5.54 ± 6.18 versus 2.14 ± 3.01 ; $p = 0.01$) and the frequency of gingivitis (58,33% versus 13.63%) were significantly increased in PRG compared to CG. PRG were characterized by a dysbiotic oral microbiota (Shannon Index: 3.32 ± 0.62 in PRG versus 3.79 ± 0.68 in CG; $p = 0.03$) with an increase of *Streptococcus* (58.43 ± 16.84 versus 42.60 ± 17.45 ; $p = 0.005$), the main genus implicated in caries. Predicted metagenomics of oral microbiota in rugby players was suggestive of a cariogenic metagenome favourable to the development of caries.

Conclusions: Our study shows that the oral health of PRG was poorer than the general population. PRG are characterized by a dysbiotic oral microbiota with an increase of the relative abundance of *Streptococcus* genus, positively correlated to the weight and negatively correlated to the diversity of oral microbiota.

Clinical significance: Dental screening should be included in the medical follow-up of professional rugby players as a part of their health management. New strategies such as using probiotics like *Lactobacillus* could help to control the dysbiosis of oral microbiota.

1. Introduction

Oral health status in athletes is a growing concern that could negatively affect sporting performance and quality of life [1,2]. Poor oral health in elite athletes has notably been reported during the 2012

London Olympic Games [1]. Chronic diseases like dental caries or periodontal diseases are the most frequently observed but the corresponding causal relationship remains unclear. A recent systematic review emphasized the poor oral health of elite athletes [3] including 20% of women. Therefore, there is an urgent need to identify causal

* Corresponding author at: Vincent Blasco-Baque. INSERM UMR1048-I2MC Team 2 « Intestinal Risk Factors, Diabetes and Dyslipidemia », Building L4, 1st floor, Rangueil Hospital 1, Avenue Jean Poulhès, BP 84225 31432, Toulouse Cedex 4, France.

E-mail address: vincent.blasco@inserm.fr (V. Blasco-Baque).

¹ Equal contribution.

² All authors gave final approval and agreed to be accountable for aspects of work ensuring integrity and accuracy.

<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.10.001>

Received 25 May 2018; Received in revised form 29 September 2018; Accepted 3 October 2018

0300-5712/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

factors, which could hamper the wellbeing of athletes.

Among professional sports, the practice of rugby requires an intense physical activity. Since the introduction of professionalism in 1995, the popularity of rugby has increased. According to World Rugby, the worldwide number of registered players is estimated around 3.2 million individuals [4]. Considering dental health, rugby players mainly suffer from dental trauma experience [5–7] and from the use of mouthguards [8,9]. Apart from these traumatic experiences, little is known about the pathophysiologic mechanisms through which an intense practice of rugby impairs oral health.

A first hypothesis related to oral impairment of professional athletes, is the modification of diet and oral hygiene habits [3]. In order to obtain their energy needs, professional sportsmen have to increase the frequency of food intakes by collation or energy drinks, encouraging the use of carbohydrate substrates [10]. The increase in the frequency and quantity of intake of dietary sugars is one of the most important risk factors for dental caries [11]. Carbohydrate-rich meals are the most cariogenic because they promote the colonization of bacterial plaque with cariogenic microorganisms like *Streptococcus*, promoting the production of acids. Associated with an increase in sugar intake, athletes declared less frequent dental brushing and dental check-ups. The combination of feeding disorders and poor oral hygiene has a preponderant role in the appearance of carious pathology [12].

Another hypothesis for poor oral health would be the alteration of the immune tone. It has been previously reported that the practice of high-level sport impacts on the immune and cardiovascular systems [13]. The intense physical exercise increases the levels of pro-inflammatory cytokines and inhibits the activity of innate immune cells [14]. Therefore, athletes are affected by a temporary immune-suppression called an “open window” which could impair oral homeostasis [15]. These immune disorders could be implicated in the disruption of oral microbiota linked to an intensive sport practice. The oral cavity is one of the most diverse niches for buccal microbiota, composed of more than 10^{10} bacteria comprising over 450 species in adulthood [16,17]. A dysbiosis, namely a break in the equilibrium (eubiosis) of the oral microbiota, could induce the oral disorders like caries and periodontal diseases [18]. Thus, causally linked to the impaired immune system, an oral dysbiosis induced by intensive sport may drive oral diseases like dental caries [19] and chronic infections associated with a pathologic biofilm [20]. Moreover, a decrease in salivary flow and an increase in the salivary pH are also found in elite athletes [14]. This together with the disrupted immunity could induce a dysbiosis, leading to chronic dental diseases in athletes.

In the light of the aforementioned evidence, the aim of this paper was to evaluate the oral health in elite rugby players compared to the general population. The secondary objectives were to assess the gingival status of elite rugby players and to analyse the microbiological composition and pH of their saliva, through oral examination and salivary sampling.

2. Methods

We followed the STROBE statement guidelines for reporting observational studies [21]; the observational study reported here was approved by the *Commission Ethique du Département de Médecine Générale de Midi Pyrénées* (decision July, 30th 2015).

2.1. Study design and eligibility criteria

The authors attest that each participant gave informed consent for study participation and agreement for an oral examination and biological analyses of saliva and dental plaque. All subjects included had to write and sign a consent form after we explained them the principle and the course of the study. Thus, people agreed to participate when they received clear and detailed information.

This study used an observational, matched case-control design. A

convenient sample, based on the availability of professional rugby players in the geographic area of the study, was used to select cases. Only males were included since there were no women professional rugby player in France in 2016 for rugby XV. Inclusion criteria for cases were 1) being a professional rugby player registered in the « Union Sportive Colomiers Rugby » (south-west of France); 2) agreement for an oral examination and biological analyses of saliva and dental plaque and 3) full understanding of the consent form and signed agreement for participation. We labelled this group the Professional Rugby-player Group (PRG). Control subjects (Control Group, CG) were males from the same geographic area and not professional rugby players. Inclusion criteria for controls was the same as criterion #2 and #3. The presence of any systemic disease or salivary gland disorders that could have a negative effect on oral health (e.g. severe uncontrolled metabolic disease, cardiopulmonary failure, active uncontrolled infection, radiation or chemotherapy for cancer treatment) was a criterion of non-inclusion for both groups. For the two groups, the use of antibiotic drugs 3 weeks before the analysis was a criterion of non-inclusion. Following these criteria, one Professional Rugby-player and two potential control subjects were not included in this study.

2.2. Data collection

Data were collected over 4 months from July to October 2016 during training periods for rugby players. Cases were examined on the premises of the *Union Sportive Colomiers Rugby*, and control subjects in the Dental Service of Hospital University Centre of Toulouse, under the same procedural conditions. Controls were recruited in the dental service using a matching strategy: for each case, one corresponding random control was included according to gender (i.e. only men were included), age and education level.

2.3. Medical and socio-demographic characteristics

Efforts to reduce potential confusing biases were made by collecting information on:

- dietary and diet supplementation using standardized questionnaires [22]. To evaluate whether the differences in oral microbiota and oral diseases could be linked to food habits, we evaluated the quantity and the frequency of food intake and the type of foods eaten.
- general and oral quality of life along with socio-demographic parameters, medication uses and lifestyle habits.
- the use of medical and dental services (questions on the last visit to the dentist and the level of stress scored on a 10-points scale).
- oral hygiene-related behaviours [23].

2.4. Oral health characteristics

The WHO criteria were used to diagnose the caries status (DMF index) of each participant (ref 5th edition, Geneva), focusing only on the decaying origin of missing or filled teeth, in accordance with the WHO guidelines on clinical examination in epidemiological studies (http://www.who.int/oral_health/publications/9789241548649/en/), along with the Significant Caries Index (SiC) of each group. Gingival status was assessed using the Loe and Sillness index (LSI), the plaque index (PI) and bleeding on probing (BOP) [24]. Four graduated dentists conducted the oral health examinations. Prior to inclusion, all of the four examiners were trained in a calibration process that focused on both caries and gingival status. The examiners were calibrated in the use of the DMF and LSI, PI and BoP indices, using iconographic guidelines and presentation of required specific material (probes, mirrors and examination position).

2.5. Oral microbiota sampling

To evaluate correctly the composition of oral microbiota and to prevent the contamination from foods, we cleaned the mouth of participants during 1 min with sterile water. Saliva was sampled between 09.00 a.m. and 10.30 a.m., directly into sterile tubes. Subjects were not allowed to drink or eat 2 h before sampling. The saliva was sampled after chewing a sterile paraffin bloc for 1 min. Then, a part of saliva was directly used for bacterial culture and the remaining was frozen into liquid nitrogen and stored at -80 °C for taxonomic analysis of the oral microbiota.

2.6. Oral microbiota analysis

The oral microbiota was analysed by two different procedures: bacterial culture to determine the number of live bacteria and rDNA16S sequencing to define the bacterial composition.

2.6.1. Bacterial culture

After Vortexing for 30 s, the samples of saliva were tenfold serially diluted in Wilkins-Chalgren broth (WC, Oxoid, Basing-stoke, Hampshire, UK). Appropriate dilutions of saliva (10^{-4} and 10^{-5}) were plated on non selective 5% sterile defibrinated sheep blood agar plates (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) supplemented with 0.0002% menadione sodium bisulfite and 0.4% hemin chloride for total aerobic/anaerobic bacterial count. Agar plates were then set in the chamber for 5 days at 37 °C [25]. Counting of aerobic bacteria was carried out according to Bergey's manual criteria [26].

2.6.2. Taxonomic analysis of the oral microbiota

Total DNA was extracted from frozen saliva using a Qiamp Cador Pathogen Mini kit (ref 54,106) from QIAGEN. Subsequently we analyzed the hypervariable V2 to V4 regions of the 16S bacterial ribosomal DNA (16S rDNA) for purpose of taxonomy. The V2-V4 hyper-variable regions of the 16S rDNA were amplified and sequenced using the Illumina-MiSeq technology (2 × 300 bp). Briefly, after demultiplexing of the bar-coded Illumina paired reads, single read sequences were cleaned and paired for each sample independently into longer fragments. The MiSeq technique was applied to generate an average of 10,000 sequences per sample by the Research and Testing Laboratory (<http://rtlgenomics.com/where-we-came-from/>). For a complete description of applied bioinformatic filters, see http://www.rtlgenomics.com/docs/Data_Analysis_Methodology.pdf.

2.7. Data management and analysis

Data were blinded to maintain participant confidentiality. Unpaired Mann-Whitney tests were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows Vista (GraphPad Software, San Diego, CA). For Tables 1 and 2, the statistical significance level was set at $p < 0.05$ with no corrections in multiple comparisons. We applied the Benjamini-Hochberg correction for multiple comparisons (false-discovery rate < 0.05) only for the analysis of correlations between DMF and Streptococcus species abundance in Supp. Table 2 [27]. The taxonomic output matrix derived from 16S rDNA sequencing, containing the count data for OTUs per sample, was processed with the online Galaxy interface for LEfSe algorithm [28] (linear discriminant analysis effect size). We used an alpha parameter significance threshold for the Kruskal-Wallis (KW) test among classes set to 0.05 and the logarithmic LDA score cut-off was set to 2.0 for cladogram generation (Figs. 1C and 2 A). To evaluate whether potential changes in oral microbiota functions were linked to the development of decays, the functional metagenome was inferred from the clustered 16S sequences count table data using the web-based version of the Piphillin algorithm (<http://secondgenome.com/Piphillin>) [29]. This algorithm uses direct nearest-neighbor matching between 16S rRNA amplicons and genomes

Table 1

Clinical and oral parameters (data as mean ± SD); bold values corresponding to significant differences between two groups.

Parameters	Control Group (n = 22)	Professional Rugby players Group (n = 24)	P value
Physiognomical and acquired characteristics			
Age (years)	26.59 ± 3.87	27.29 ± 4.66	p = 0.584
Weight (kg)	75.63 ± 8.23	105.70 ± 12.01	p = 1.20×10^{-12}
Height (m)	1.79 ± 0.06	1.86 ± 0.08	p = 0.001
BMI (kg/m ²)	23.52 ± 2.29	30.65 ± 2.96	p = 1.22×10^{-11}
Stress Score	2.68 ± 1.42	4 ± 2.79	p = 0.035
Missing (M)	0.23 ± 0.61	0.70 ± 1.73	p = 0.22
Filled (F)	1.5 ± 2.55	2.29 ± 2.71	p = 0.31
Current evolutionary characteristics			
SIC INDEX	5.71	11.88	
DMF Index	2.14 ± 3.01	5.54 ± 6.18	p = 0.01
Decayed (D)	0.63 ± 1.64	1.38 ± 1.99	p = 0.04
Bleeding on probing (BOP)	24.85 ± 15.29	25.26 ± 24.48	p = 0.94
Plaque Index (IP)	2.82 ± 4.06	9.48 ± 12.90	p = 0.02
Loe Sillness Index (LSI)	0.17 ± 0.18	0.38 ± 0.44	p = 0.04
Diagnostic of Gingivitis	3 (13.63%)	14 (58.33%)	Odds Ratio : 0.2389 IC 95% [0.0388; 1.0205] p = 0.042
Saliva pH	7.59 ± 0.50	7.88 ± 0.44	p = 0.0429
Dental Check-up in last 12 months	17 (77.27%)	5 (20.83%)	p = 0.035

Table 2

Relative abundance (%) for taxonomic groups identified by single letters in cladogram and for each Streptococcus species identified in each group (data as mean ± SD).

Relative abundance (%) in oral microbiota	Control Group (n = 22)	Professional Rugby players Group (n = 24)	P value
(%) for taxonomic groups identified by single letters in cladogram			
<i>Faecalibacterium</i>	0.02 ± 0.03	0.001 ± 0.006	p = 0.0003
<i>Aggregatibacter</i>	0.03 ± 0.08	0.03 ± 0.05	p = 0.0155
<i>Kingella</i>	0.08 ± 0.11	0.02 ± 0.04	p = 0.0032
<i>Cytophaga</i>	0.10 ± 0.13	0.03 ± 0.03	p = 0.0109
<i>Fusobacterium</i>	2.96 ± 3.38	0.80 ± 1.09	p = 0.0058
<i>Haemophilus</i>	3.76 ± 4.08	0.80 ± 1.22	p = 0.0003
<i>Porphyromonas</i>	5.06 ± 6.84	2.59 ± 4.55	p = 0.0348
<i>Rothia</i>	5.80 ± 6.19	13.95 ± 8.67	p < 0.0001
<i>Neisseria</i>	9.01 ± 10.66	1.56 ± 1.76	p = 0.0062
<i>Streptococcus</i>	42.60 ± 17.45	58.43 ± 16.84	p = 0.0054
(%) for each Streptococcus species identified in each group			
<i>Streptococcus gordonii</i>	0.26 ± 0.23	0.35 ± 0.42	p < 0.0001
<i>Streptococcus porcorum</i>	0 ± 0	0.003 ± 0.010	p < 0.0001
<i>Streptococcus sobrinus</i>	0.0008 ± 0.004	0.019 ± 0.065	p < 0.0001
<i>Streptococcus sp</i>	41.76 ± 13.38	55.64 ± 17.90	p < 0.0001
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0.54 ± 0.72	2.28 ± 2.96	p < 0.0001
<i>Streptococcus; Unknown</i>	0.016 ± 0.019	0.017 ± 0.025	NS
<i>Streptococcus mutans</i>	0.03 ± 0.06	0.118 ± 0.212	p < 0.0001

to predict the represented genomes. Through this inference process, the abundance values of each OTU were normalized to their respective predicted 16S rRNA copy numbers and then multiplied by the respective gene counts for metagenome prediction. The resulting core output was a list of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) orthologues and predicted gene count data for each sample. We used in-

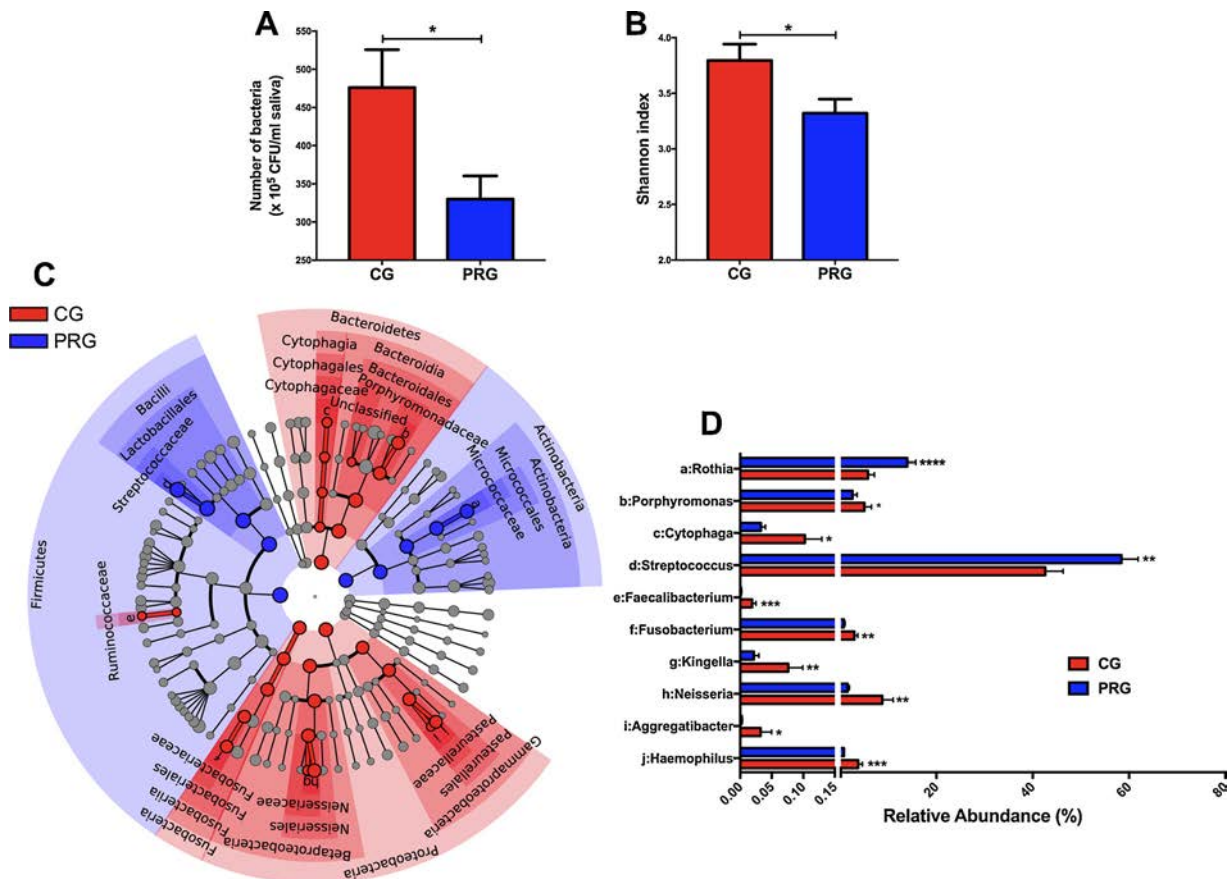


Fig. 1. Oral (saliva) microbiota dysbiosis in professional rugby players group (PRG) compared to control group (CG). A) Number of Colony Forming Unit (CFU) in 1 ml of saliva from Control group (CG, red bar) and professional rugby players group (PRG, blue bar); B) α -diversity by the Shannon index; C) Linear Discriminant Analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) cladogram of pairwise analysis of the professional rugby players and control groups for 16S rDNA sequence analysis of saliva samples (the cladogram shows the taxonomic levels represented by rings with phyla at the innermost ring and genera at the outermost ring, and each circle is a member within that level); D) histogram for relative abundance (%) for taxonomic groups identified by single letters in cladogram. (Data as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, unpaired Mann-Whitney test and LDA score 2.0 for cladograms).

house scripts to parse the output into KEGG module categories for functional pathway hierarchy using the KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/module.html>). The output matrix containing the relative abundance of KEGG orthologous groups (KO) per sample was processed with the online Galaxy interface for LEfSe using an alpha parameter significance threshold for the Kruskal-Wallis (KW) test among classes set to 0.05 and the logarithmic LDA score cut-off was set to 2.0. Respective cladograms were generated with modules at the lowest level. Next we performed a principal component analysis (PCA) to identify which parameters characterize best PRG. Among these variables are bacterial groups in the oral microbiota identified by the cladogram and clinical parameters such as age, weight, height, stress, pH, quantity of bacteria, Shannon index, Decay, Missing and Filled teeth (DFM Index), Loe Sillness Index (LSI), plaque index (PI) and bleeding on probing (BOP).

3. Results

A group of 24 professional rugby players (PRG) and a group of 22 control subjects (CG) were recruited and DNA was extracted from saliva.

3.1. Characteristics of the cohort

As reported in Table 1, the mean age of PRG (27.29 ± 4.66 years old) was not significantly different ($p = 0.584$) from that of CG (26.59 ± 3.87 years old). In contrast, and because of the practice of

rugby by professional players, the mean body weight (105.70 ± 12.01 kg) and height (1.86 ± 0.08 m) of PRG were significantly higher than in CG (75.63 ± 8.23 kg and 1.79 ± 0.06 m, respectively, $p < 0.001$ for both) as well as the body mass index (BMI) (30.65 ± 2.96 vs 23.52 ± 2.29 , $p < 0.001$). The stress score was also higher in PRG compared to CG (4 ± 2.79 vs 2.68 ± 1.42 , $p = 0.035$). Concerning food habits, the number of main food intakes and collations were significantly higher in PRG compared to CG (4.08 ± 1.21 vs 2.94 ± 0.65 , $p = 0.0024$; $1.46 (\pm 0.83)$ vs 0.6 ± 0.63 , $p = 0.0024$, respectively, Supp. Table 1) whereas the proportion of snacking, pizza, soda and alcohol were lower in the PRG compared to CG.

3.2. Oral health

The frequency of dental check-ups was significantly higher in the CG compared to the PRG (77.27% vs 20.83% in the last 12 months, $p = 0.035$) (Table 1). The Decay, Missing and Filled teeth index (DMF index) was significantly higher in the PRG (5.54 ± 6.18) compared to CG (2.14 ± 3.01 , $p = 0.01$), and higher scores regarding each component of the DMF index were observed. The Significant Index Caries (SIC Index) was also higher in the PRG (11.88) than in CG (5.71) (Table 1). The DMF index of CG is consistent with recent studies in France [30]. To complete the check-up of oral health, we analysed the gingival status. The Loe Sillness Index (LSI) and plaque index (PI) were significantly higher in the PRG but no significant difference for bleeding on probing (BOP) was observed. There was no diagnosis of periodontitis. However, gingivitis was more frequent in PRG than in CG

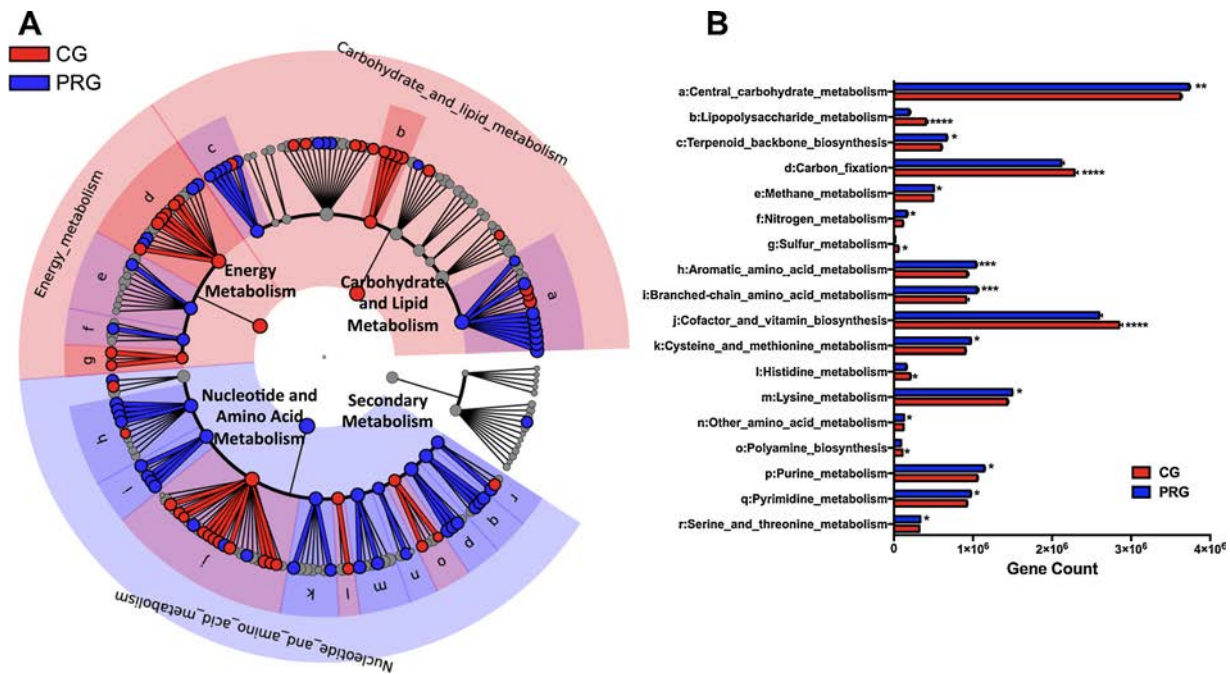


Fig. 2. Cariogenic microbiome in professional rugby players group (PRG) compared to control group (CG). A) LefSe cladogram of pairwise analysis of Piphillin [29] predicted microbial metabolic pathways in the saliva of professional rugby players (PRG, blue) and control groups (CG, red) (the cladogram shows the KEGG pathway hierarchy represented by rings with the KO/modules at the outermost ring and each circle is a member within that level. Taxa at each level and KEGG modules are shaded according to the group in which it is more abundant); B) histogram for gene count of microbial pathways identified by single letters in cladogram. (Data as mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, unpaired Mann-Whitney test and LDA score 2.0 for cladograms).

(Table 1). The pH of saliva was significantly higher in PRG (7.88 ± 0.44) than in CG (7.59 ± 0.50 ; $p = 0.0429$) (Table 1), with no difference between the salivary volumes sampled (saliva volume $1.74 \text{ ml} \pm 0.40$ in PRG vs $1.75 \text{ ml} \pm 0.29$ in CG; $p = 0.42$).

3.3. Analysis of taxonomic composition and functional microbial-predicted composition of oral microbiota in professional rugby players compared to the control group

To evaluate whether the changes observed in clinical oral features were linked to an oral microbiota dysbiosis, we analysed the quantity and the composition of the oral microbiota in both groups. The total number of bacteria and the diversity of oral microbiota (according to the Shannon index, 3.32 ± 0.62 in PRG vs 3.79 ± 0.68 in CG; $p = 0.03$) were significantly decreased in PRG compared to CG (Fig. 1A,B, respectively). In particular, *Streptococcus*, the main genus implicated in DMF [31], was significantly higher in PRG ($58.43\% \pm 16.84$ vs $42.60\% \pm 17.45$; $p = 0.005$), as was the genus *Rothia* ($13.95\% \pm 8.66$ vs $5.80\% \pm 6.19$; $p < 0.0001$), as shown by the cladogram, based on linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) and the related histograms (Fig. 1C,D, respectively and Table 1). The spearman correlation between DMF and *Streptococcus thermophilus* species abundance in PRG identified a correlation with *Streptococcus thermophilus* species (Supp. Table 2). Moreover, we show an increase in the abundance of each species of *Streptococcus* in PRG (Table 2), and in particular in species implicated in caries. For example, we show a large increase in the relative abundance of *S. mutans* (0.118 ± 0.212 in PRG vs 0.03 ± 0.06 in CG, fold change 3.93), *S. thermophilus* (2.28 ± 2.96 in PRG vs 0.54 ± 0.72 in CG, fold change 4.22), and *S. sobrinus* (0.019 ± 0.065 in PRG vs 0.0008 ± 0.004 in CG, fold change 23.75) and a small increase for *S. gordonii* (0.35 ± 0.42 in PRG vs 0.26 ± 0.23 in CG, fold change 1.34). The oral microbiota in CG was dominated by genera from the Proteobacteria and Bacteroidetes phyla compared to PRG (Fig. 1C,D) and especially an increase of *Neisseria* (9.01 ± 10.66 vs 1.56 ± 1.76 ; $p = 0.0062$), *Porphyromonas*

(5.06 ± 6.84 vs 2.59 ± 4.55 ; $p = 0.0348$), *Haemophilus* (3.76 ± 4.08 vs 0.80 ± 1.22 ; $p = 0.0003$) and *Fusobacterium* (2.96 ± 3.38 vs 0.80 ± 1.09 ; $p = 0.0058$).

To evaluate whether the changes in oral microbial functional capabilities could be linked to the development of decays, we analysed the predicted microbial metagenomes of oral microbiota using the Piphillin [29]-algorithm (Fig. 2). This algorithm predicts potential metagenomes by calculating, for annotated genes within a known sequenced database such as the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), the number of OTUs in 16S rRNA data set. The composite predicted metagenomes were parsed into KEGG-derived modules for metabolic pathways. Two major pathways stand out as being potentially modulated in relation to the oral status: 1) the central-carbohydrate-metabolism pathway (implicated in the metabolism of carbohydrate in the oral cavity) was increased in PRG and 2) the lipopolysaccharide-metabolism pathway (implicated in the composition of the external membrane of Gram-negative bacteria) significantly decreased in PRG compared to CG (Fig. 2A, B).

The overall data reported above show that PRG vs CG subjects are distinguished by a specific oral health status as well as by their oral microbiota and predicted microbiome. The association of the PRG with a dysbiotic oral microbiota compared to CG, promotes the central-carbohydrate-metabolism pathway that may be linked to decays.

3.4. Multivariate analysis between clinical parameters and oral microbiota in professional rugby players compared to control group

We performed a Principal Component Analysis (PCA) by generating a matrix of both clinical and oral microbial parameters to understand the relatedness of the two groups. As shown in Fig. 3, the PCA identified a distinct cluster for each group of subjects. Moreover, a linear regression analysis showed that the abundance (%) of the genus *Streptococcus* in the oral microbiota was significantly and negatively correlated with the diversity of oral microbiota according to the Shannon index (Fig. 3, inset, bottom right). In contrast, *Fusobacterium* abundance (%)

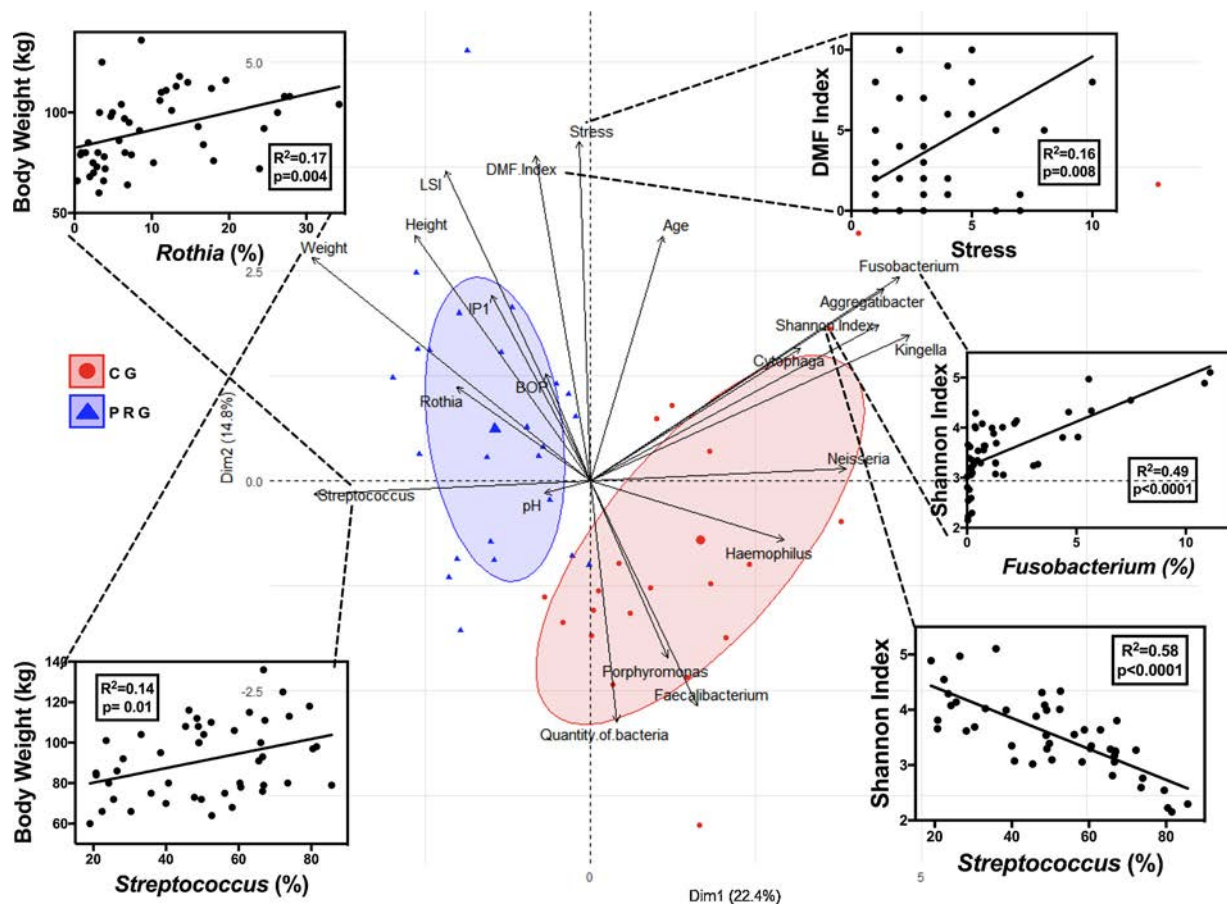


Fig. 3. Principal Component analysis (PCA) between dominant bacterial genera from oral (saliva) microbiota and oral and systemic clinical parameters. The parameters are: age, weight, height, stress, pH, quantity of bacteria in saliva, Shannon index, Decay, Missing and Filled teeth (DMF Index), Loe Sillness Index (LSI), plaque index (IP) and bleeding on probing (BOP); the five insets represent the correlation between Weight and *Rothia* genus (top left), Weight and *Streptococcus* genus (bottom left), Shannon Index and *Streptococcus* genus (bottom right), Shannon Index and *Fusobacterium* genus (centre right) and the DMF Index with Stress score (top right).

was significantly and positively correlated with the diversity of oral microbiota (Fig. 3, inset, centre right). Furthermore, *Rothia* and *Streptococcus* abundances (%) were significantly and positively correlated with body weight (Fig. 3, insets top left and bottom left, respectively) and we found a significant and positive correlation between Stress and DMF index (Fig. 3, inset top right).

4. Discussion

Here, we show that the oral health of professional rugby-players was poorer than that of the general population, especially for caries and gingival disorders. In addition, we establish the first relationship between the DMF index and dysbiotic oral microbiota in professional rugby players. This dysbiotic oral microbiota is dominated by *Streptococcus*, and notably *Streptococcus mutans* and *thermophiles*, that may enhance the development of caries.

We show that the high incidence of caries, which was previously observed in other elite athletes [1,2,3], is also true in rugby players. This is due to a poor oral health in elite athletes mostly due to nutritional challenges such as an increased number of food intakes and a lower frequency of dental check-ups. In addition, the impairment of the immune response which has been described in other studies in elite athletes, could also impact on the poor oral health [32]. The disruption of immunity associated with an augmentation of food intake could be linked to dysbiosis of microbiota.

The oral cavity presents complex and multiple bacterial microbiota with a large diversity of about 450 species at adult age [33] and

professional rugby players are characterized by a disruption of this eubiosis. *Rothia* and *Streptococcus* are the most common genera in oral microbiota and the disruption of their equilibrium could induce local and systemic disease [34]. In this study we applied a 16S rDNA-based sequencing rather than other sequencing techniques [35] because we aimed at studying the microbial diversity of the oral cavity at a taxonomic level. This allowed focusing on putative changes of microbial taxa that we may identify and based on a relative high number of sequences to get with a reasonable cost. Moreover, the PICRUST (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states) analysis [36] allows the predictive study of the microbiome based on 16S rDNA sequences, completing the investigation of the diversity of a given microbial population, i.e. that of the oral cavity. The maintenance of this diversity produces various immune bacterial metafactors that contribute to healthy symbiosis between the oral microbiota and oral tissue [37]. The increase in the proportion of *Streptococcus* shown in our data is one of the first steps in the development of carious lesions. *Streptococcus* causes a specific pathogenic biofilm responsible for the development of carious lesions [20]. Regarding the fold increase of specific *Streptococcus* (*S*) species in our study, we showed that in PRG versus CG, *S. sobrinus* increased by 23.7 fold, *S. thermophilus* by 4.22 fold, *S. mutans* by 3.93 fold and *S. gordonii* by 1.34 fold. Interestingly, *S. mutans* and *S. sobrinus* are best acidifying *Streptococcus* [38] and correlate negatively with alkalinisation by arginine or urea [39]. Finally, *S. thermophilus* is known as a good lactic-acid-producing bacteria [40]. Thus, the four species we identified as increasing in the PRG were acidifying bacteria favouring caries and the

metabolism of carbohydrate. We could not exclude that different microbial modulations could have been obtained based on both the hyper-variable region to target or a complete different sequencing approach such as a shot-gun metagenomics analysis. Interestingly, predicted metagenomics shows an increased number of bacterial genes linked to carbohydrate metabolism suggestive of a role for the products of these genes in PRG due to their frequent intake of dietary sugars, (Supp. Table 1). This would therefore favour the increased proportion of *Streptococcus* in oral microbiota as a risk factor for carious development. Indeed, some opportunistic bacteria for the development of caries like *Streptococcus mutans* have a specific collection of virulence factors, allowing them to invade the tooth tissue and subsequently to induce caries. Moreover, *Streptococcus* promotes the adherence of other cariogenic bacteria to tooth-biofilm by producing extracellular polysaccharides. Inside the cariogenic biofilm, *Streptococcus mutans* produces many enzymatic complexes capable of metabolizing sugars from foods [41]. The increased metabolism of these carbohydrate-metabolizing enzymes found in the oral microbiome of PRG (Fig. 2) may produce acids which alter the tooth minerals [42].

We also identified an increase in the pH of saliva which may change the microenvironment of bacteria favouring a dysbiotic microbiota [43]. Saliva content varies during the day according to the meals [44] or physical activity [45]. The difference of pH in saliva between the two groups is an adaptation to the intense activities, the increase of food intakes and the xerostomia linked to high levels sport practices. Other studies showed the effect of pH on the growth of microorganisms like *Streptococcus spp.* involved in oral disease [46]. The modulation of pH could be a key factor to induce a dysbiotic oral microbiota in elite sportsmen. Although we did not measure immune parameters, it is known that local and systemic immune-suppression called an “open window” is frequent in intensive sport practice [14] and could also be causal to the oral microbiota dysbiosis. Consequently, this would affect buccal homeostasis and promote the development of oral diseases like caries [47]. The saliva sampling in specific population could be a new procedure to complete the oral care. The identification of a dysbiosis in saliva could propose new approaches of treatment based on pre- or probiotics. The analysis of pH and biochemical composition of saliva could help identifying risk factors for caries and suggest therapeutic strategies. The saliva sampling is not invasive and could represent a new practice for dental treatment in elite sportsmen.

In conclusion our results suggest that risk factors including an oral microbiota dysbiosis, characterized by an elevated ratio of cariogenic over non-cariogenic bacteria and an increased sugar intake could favour caries in elite athletes.

4.1. Strengths and limitations

We acknowledge that our sample is probably not representative of the worldwide or even the national population of PRG. As this is the first analysis of oral microbiota in PRG, it will be important to replicate this study in different samples of rugby players and elite athletes from other sports, allowing a better understanding of the links between intense practice of sport and oral health.

We also acknowledge that the statistical power may have been insufficient to identify some potential differences between the two groups: for example, the DMF index was significantly higher in PRG, while that for missing and filled components was not. However, the results were quite robust, with the oral health of rugby players tending to be consistently poorer than controls. Moreover, putative metabolic pathways identified from microbiological analyses (e.g. carbohydrate) were consistent with clinical differences observed between the two groups, alleviating to some extent the statistical power limitation.

It should also be acknowledged that there could be a measurement bias, since dental examiners could not be blinded from the case-control status of participants, especially regarding physical appearance of professional rugby players. We could have added body weight in the

matching strategy of the study, however this would have led to interpretation problems. In the present study, we considered that rugby players should be compared to a population of non-obese adults due to their high proportion of muscle mass [48], since overweight control subjects would not be comparable with heavy but fit and muscular rugby players.

4.2. Clinical practices

Our study describes, for the first time, that PRG more frequently have dental caries and gingivitis and that this could be linked to a dysbiotic oral microbiota. Previous works have focused on the clinical description of athlete’s oral health status. Our study analysed in parallel the clinical status and the composition/metabolic pathways of oral microbiota in professional rugby players compared to general population. In view of the results, we identified for the first time, a dysbiosis of oral microbiota associated with a poor oral health in athletes. We could propose specific adaptations for dental care and microbial strategies for PRG in order to improve individual awareness on oral health. We identified in the PRG an increase in *Streptococcus*, the main genus of caries diseases. The higher consumption of meat and carbohydrates could explain the disruption of oral microbiota in these professional athletes.

Good oral health and optimal dental balance are paramount in the general population as well as in athletes. It is essential to prevent the acidic attack produced by bacteria from cavities. We also have to protect the periodontium that remains essential for the maintenance of the tooth. Periodontal disease often develops silently and painlessly, and a delayed diagnosis could induce irreversible damage such as bone loss. We propose prevention with a number of simple actions to protect oral health.

Professional rugby players should: 1) increase the frequency of brushing, due to the increased number of meals as already shown [12]; 2) use dental floss targeting inter-proximal areas 3) use high level fluoride preparations [49] that could induce mineralization of enamel and antibacterial actions to reduce the susceptibility to cavities. To manage and/or limit the dysbiosis, strategies using probiotics (e.g. based on *Lactobacillus*, the main genus known to protect against cavities [50]) and prebiotics, could help in controlling the increase of *Streptococcus* in oral microbiota.

Since the frequency of dental check-ups is poor in PRG, a regular dental examination should be organised at the level of national leagues, rugby clubs and personal coaches. Dental screening should be included in the medical follow-up of professional rugby players as a part of their health management. In conclusion, the prevention and the detection of oral diseases are essential to avoid their deleterious effects on systemic health and consequently on sporting performances. For oral prevention, the analysis of saliva microbiota of athletes may be predictive for the susceptibility of caries and periodontal diseases.

5. Conclusions

In conclusion, our results show that professional rugby players are characterized by a poor oral health with an increase of the DMF index and the frequency of gingivitis compared to the general population. This impaired oral health is associated with a dysbiotic oral microbiota characterised by an increase of *Streptococcus*, and a predicted microbiome distinguishing elite rugby players as more cariogenic when compared to the general population.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests and no conflict of interests.



Gender-associated differences in oral microbiota and salivary biochemical parameters in response to feeding

M. Minty^{1,2,3} · P. Loubières^{1,2,3} · T. Canceill^{3,4} · V. Azalbert^{1,2} · R. Burcelin^{1,2} · F. Tercé^{1,2} · V. Blasco-Baque^{1,2,3,5} Received: 15 November 2019 / Accepted: 30 June 2020
© University of Navarra 2020

Abstract

Saliva plays a key role in food absorption and digestion mainly due to both its enzymes and microbiota. The main objective of this study was to compare the oral microbiota and salivary parameters between men and women in response to feeding. To answer this question, we set up a pilot study on 10 male and 10 female subjects to examine the role of saliva in glycaemia physiology. Biological parameters and the microbiotal composition of saliva were analyzed in fasted and fed states. The results show that the level of blood glucose was not different between men and women in the fasted state (88.00 mg/dL \pm 6.38 vs 87.00 mg/dL \pm 8.07, $p = 0.9149$) or in the fed state (102.44 mg/dL \pm 14.03 vs 116.9 mg/dL \pm 25, $p = 0.1362$). Free fatty acids (FFA 0.15 mmol/L \pm 0.15 vs 0.07 mmol/L \pm 0.07, $p = 0.0078$), cholesterol (0.53 mmol/L \pm 0.30 vs 0.15 mmol/L \pm 0.14, $p < 0.0001$), and total saliva proteins (13.2 g/L \pm 4.31 vs 9.02 g/L \pm 6.98, $p = 0.0168$) were decreased after feeding, as well as the saliva lipase (27.89 U/L \pm 25.7 vs 12.28 U/L \pm 4.85, $p = 0.0126$). A very significant increase in the relative abundance of Streptococcaceae (24.56 \pm 9.32 vs 13.53 \pm 7.47, $p = 0.00055$) and a decrease in Prevotellaceae (34.45 \pm 9.30 vs 17.43 \pm 9.03, $p = 0.00055$) were observed in the fed condition. When investigating gender-related differences in the fasted state, men showed higher levels of cholesterol (0.71 mmol/L \pm 0.26 vs 0.40 mmol/L \pm 0.27, $p = 0.0329$), FFA (0.25 mmol/L \pm 0.18 vs 0.08 mmol/L \pm 0.06, $p = 0.0049$), and triglycerides (0.24 mmol/L \pm 0.15 vs 0.09 mmol/L \pm 0.04, $p = 0.006$) than women. Finally, differences could be observed in saliva microbiota between men and women in the fasted condition but even more in the fed condition, where *Porphyromonas* and *Capnocytophaga* were overrepresented in the male salivary samples compared with female saliva. Thus, biological parameters and microbiota in saliva could be the signatures of the feeding conditions and sex gender status.

Keywords Sex gender · Oral microbiota · Salivary · Glycaemia

Key points

1. Feeding modified the salivary biological parameters of saliva.
2. The oral microbiota was also modified after feeding.
3. The sex gender was associated with a particular “signature” of oral microbiota in fed and fasted conditions.
4. Saliva showed differences in both microbiota composition and biological parameters between males and females.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13105-020-00757-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ V. Blasco-Baque
vincent.blasco@inserm.fr¹ Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), INSERM U1048, F-31432 Toulouse, France² Université Paul Sabatier III (UPS), F-31432 Toulouse, France³ Service d'Odontologie Toulouse, CHU Toulouse, F-31000 Toulouse, France⁴ CIRIMAT, CNRS, INPT, Faculté de Pharmacie, University of Toulouse, Université Paul Sabatier, 35 Chemin des Maraichers, 31062 Toulouse Cedex 9, France⁵ INSERM UMR1048-I2MC Team 2 “Intestinal Risk Factors, Diabetes, and Dyslipidemia”, Hospital of Rangueil, Building L4, 1st floor, 1, Avenue Jean Poulhès BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

Introduction

All components of saliva contribute to oral functions like digestion and immune protection. Secretion of saliva by the parotid and sublingual salivary glands plays a key first role in food absorption and digestion, mainly by the presence of enzymes [38]. Salivary amylase initiates the digestion of starch, lingual lipase begins fat digestion, and a large variety of other enzymes protect against pathogens and commensal bacteria. Since saliva is the simplest bio-fluid to collect in a noninvasive way, it is of interest to assess its potential in the diagnostic or the monitoring of oral and systemic pathologies, giving an image of systemic health [12].

Over the past years, it has been shown that microbiota, a complex and dynamic population of microorganisms found in a number of organs and tissues, plays a symbiotic role in modulating human health [24]. Mainly studied in the gut, microbiota composition is found to be specific for each organ. One of the largest and most diverse microbiota is found in the mouth, at the interface with the outside world. Recent studies have clearly shown that oral microbiota communicates largely with the body via the bio-fluids and, for example, can be modulated by pro- or prebiotics to improve the fasting glycaemia in diabetic patients [5]. Thus, individual bacterial components of the microbiota can be considered “biomarkers,” and the analysis of oral microbiota (by DNA sequencing for example) may allow early identification of specific bacteria associated with diabetes. Moreover, intense interest has been directed towards the role of microbiota in the development of systemic diseases following the gender status. Gender differences have been shown in disease susceptibility, but this nevertheless remains largely ignored in therapeutic treatments [30]. These differences in both metabolic chronic diseases and in neuropsychiatric diseases [19] were initially attributed to the differential effects of the sex hormones. But a variety of other factors linked to X chromosome genes [43] and to gender-specific microbiota [2] could also contribute to these gender-related risk factors for diabetes. The gender differences related to diabetes onset and severity [21] and to differential microbiota [36] could be a consequence of dietary habits [46].

The gender-related differences found after feeding [10] need to be further characterized as part of a generalized concept of “personalized medicine” [39]. The main objective of this study was to set up a pilot study to compare the oral microbiota and salivary parameters between men and women in response to feeding. To demonstrate a gender-related link between oral microbiota and feeding status, we thus analyzed biological parameters of saliva as well as detailed microbiota composition on a cohort of 20 subjects (10 women/10 men) before or after feeding.

Materials and methods

The observational study reported here was approved by the *Commission Ethique du Département de Médecine Générale*

de Midi Pyrénées (decision July 30, 2015), and we followed the STROBE statement guidelines for reporting [49].

Study design and eligibility criteria

The authors attest that each participant gave informed consent for their participation and agreement for an oral examination and biological analyses of saliva and dental plaque. All subjects included had to write and sign a consent form giving their agreement following a clear information on the guideline and the course of the study. Thus, people agreed to participate when they received clear and detailed information.

This study used an observational control design, and inclusion criteria were:

- 1) Being a healthy subject
- 2) Agreement for an oral examination and biological analyses of saliva and dental plaque
- 3) Full understanding of the consent form and signed agreement for participation

Our study included 20 subjects (10 women and 10 men) from the same geographic area and educational level with an average age of 23.6 years for women and 24.1 years for men.

Criteria of non-inclusion were the presence of any systemic disease or salivary gland disorders that could have a negative effect on oral health (e.g., severe uncontrolled metabolic disease, cardiopulmonary failure, active uncontrolled infection, radiation, or chemotherapy for cancer treatment) or the use of antibiotic drugs up to 3 weeks before the analysis [52]. All smokers were excluded from the study to limit “bias.”

Data collection

Data were collected on May 13, 2017, in the Department of Odontology, and subjects were examined in the Dental Service of the University Hospital of Toulouse (France).

All examinations and data were collected under the same procedural conditions including a fasting blood test and a salivary specimen at 8:00 am and a postprandial blood test followed by salivary sampling at 2:00 pm. We also collected data on oral health status (the decayed, missing, and filled (*DMF*) index and gingival status) and dietary habits.

Medical and sociodemographic characteristics

Efforts to reduce potential confusing biases were made by collecting diverse information: (1) we analyzed the quantity and the frequency and type of food intake using standardized questionnaires (Sup Table 1) to evaluate whether the differences in oral microbiota and oral diseases could be linked to eating habits; (2) we recorded quality of life using a 10-point scale [50], and each participant had a score above 6; we also

included questions on the last visit to the dentist and the level of stress scored on a 10-point scale.

Oral health characteristics

The WHO criteria were used to diagnose the caries status with the decayed, missing, and filled (DMF) index of each participant (ref 5th edition Geneva), focusing only on the decaying origin of missing or filled teeth, in accordance with the WHO guidelines on clinical examination in epidemiological studies http://www.who.int/oral_health/publications/9789241548649/en/. Gingival status was assessed using the Loe and Sillness index (LSI), the plaque index (PI), and bleeding on probing (BOP) [20]. Two qualified dentists conducted the oral health examinations. Prior to testing, the examiners verified that they had exactly the same protocol for the clinic examination focusing on both caries and gingival status.

Oral microbiota sampling

To evaluate correctly the composition of oral microbiota and to prevent contamination from food, we cleaned the mouth of participants for 1 min with sterile water. The subjects did not eat or drink 2 h before saliva sampling that was obtained between 9:00 am and 10:00 am for fasting conditions. The saliva sampling was obtained 1 h after lunch for feeding conditions. The saliva was sampled after chewing a sterile paraffin block for 1 min and was collected into sterile tubes on the same day for the two conditions as reported previously [32]. Then, a part of saliva was directly used for bacterial culture, and the rest was frozen into liquid nitrogen and stored at -80°C for taxonomic analysis of the oral microbiota.

Oral microbiota analysis

The oral microbiota was analyzed by two different procedures: bacterial culture to determine the number of live bacteria and rDNA16S sequencing to define the bacterial composition.

For bacterial culture After vortexing for 30 s, the samples of saliva were diluted in Wilkins-Chalgren broth (WC, Oxoid, Basing-stoke, Hampshire, UK). Appropriate dilutions of saliva (10^{-4} and 10^{-5}) were plated on nonselective 5% sterile defibrinated sheep blood agar plates (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) supplemented with 0.0002% menadione sodium bisulfite and 0.4% hemin chloride for total aero-/anaerobic bacterial count. Agar plates were then set for 5 days at 37°C [27]. Counting of aerobic bacteria was carried out according to Bergey's manual criteria [9].

For taxonomic analysis of the oral microbiota Total DNA was extracted from frozen saliva using a QiAamp Cador Pathogen Mini kit (ref 54106) from QIAGEN. Subsequently the hyper-variable V2 to V4 regions of the 16S bacterial ribosomal DNA (16S rDNA) were analyzed for taxonomy. The V2-V4 hyper-variable regions of the 16S rDNA were amplified and sequenced using the Illumina-MiSeq technology (2×300 bp). Briefly, after demultiplexing of the bar-coded Illumina paired reads, single read sequences were cleaned and paired for each sample independently into longer fragments. The MiSeq technique was applied to generate an average of 10,000 sequences per sample by Vaiomer Laboratory (31,670 Labège France).

Biochemical analyses

Triglycerides, glucose, total proteins, free fatty acids, α -amylase, cholesterol and lipase levels were determined in saliva at the Anexplo-Crefre Phenotyping facility of Toulouse using a Pentra 400 biochemical analyzer (Horiba ABX, Kyoto, Japan).

Data management and analysis

Bioinformatics pipeline

The 16S targeted metagenomic MiSeq reads from oral samples were analyzed using the bioinformatics pipeline established by Vaiomer based on the FROGS v1.4.0 tool [15]. Briefly, after demultiplexing of the bar-coded Illumina paired reads, R1 and R2 read sequences were trimmed of, respectively, 10 and 40 bases to remove lower quality bases. Clean reads were paired for each sample independently into longer fragments using FLASH. The resulting amplicons were further cleaned by removing unspecific amplifications, i.e., fragments shorter than 350 and longer than 500 bases, or without the two PCR primer sequences (10% mismatches allowed). Operational taxonomic units (OTUs) were produced via single-linkage clustering using the Swarm algorithm v2.1.6 in two passes: the first pass is a clustering with an aggregation distance equal to 1 and the second pass with an aggregation distance equal to 3. The OTUs identified as chimeras (with VSEARCH v1.9.5) in all samples in which they are present were removed. The OTUs with abundance lower than 0.005% of the whole dataset abundance were removed. Finally, taxonomic assignment was performed in order to determine community profiles using Blast+ v2.2.30+ against the Silva 128 Parc databank.

Statistical analyses

Data were blinded to maintain participant confidentiality.

The statistical analyses were corrected with the "false discovery rate" (FDR), a method of conceptualizing the rate

of type I errors in null hypothesis testing when conducting multiple comparisons [1]. The bacterial diversity analyses (Chao1 alpha diversity and Bray-Curtis beta diversity) were performed using the Phyloseq v1.14.0 R package. The differential taxa analyses were conducted using the linear discriminant analysis effect size tool LEfSe [42] using default parameters (alpha parameter significance threshold set to 0.05 and the logarithmic LDA score cutoff set to 2.0). Unpaired Mann-Whitney tests were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). A PERMANOVA test was performed with 999 permutations to assess the statistical significance of the difference between groups in beta diversity PCoA analyses (Figs. 1b, 2b, 3b). Linear correlation tests were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) for finding statistical relationships between the fold change glycaemic (the ratio fed glycaemia/ fasted glycaemia) and oral microbiota (Sup Fig. 1) or with other biological parameters like the lipase fold change (Sup Fig. 2).

Types of analysis performed

In order to detect a possible correlation between biochemical parameters and microbiological factors of the saliva and the blood glucose levels (as a criteria for diabetes), three types of analysis have been carried out: metabolic (cholesterol, glucose, triglycerides, etc.), enzymatic (total protein, amylase, lipase, etc.), and microbiological.

Results

A group of 10 men and 10 women students were recruited for clinical examination and saliva sampling before and after feeding, and then their microbiota (following DNA extraction) and biological parameters were analyzed.

Characteristics of the participants

Table 1 presents the characteristics of the participants according to the criteria previously defined in the “Materials and methods.”

As reported, the mean age of subjects was 23.90 years old (± 2.14), with a height of 169.95 cm (± 9.03) and weight of 61.28 kg (± 12.42). The average age was similar for men and women (23.67 ± 1.12 vs 24.08 ± 2.60 $p = 0.82$). As expected, significant differences were observed between men and women in their weight ($72.33 \text{ kg} \pm 10.74$ vs $53.00 \text{ kg} \pm 4.51$, $p < 0.0001$) and height ($178.00 \text{ cm} \pm 6.36$ vs $163.92 \text{ cm} \pm 4.91$, $p = 0.0003$). The stress score was also higher for women compared with men (3.17 ± 1.91 vs 1.22 ± 0.44 , $p = 0.0031$). No significant difference was observed for the dietary habits in men and women, except for a higher soda intake for men (Sup Table 1).

Oral health

Different parameters were analyzed to determine the oral health status of participants. The DMF index (decay, missing,

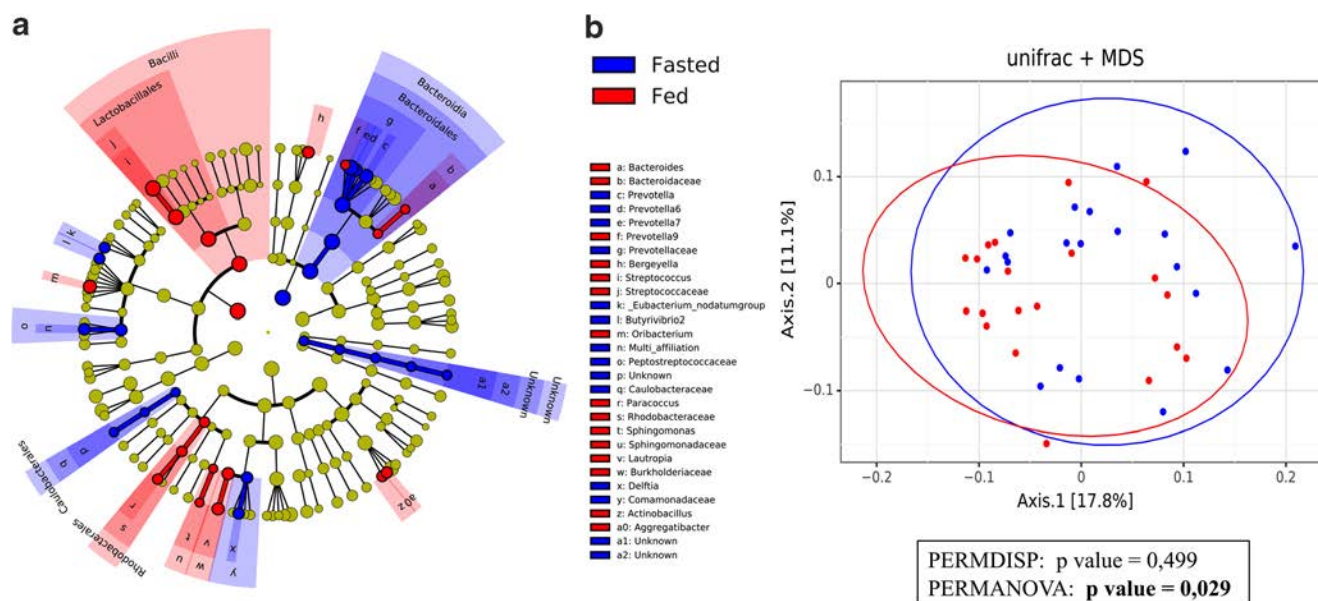


Fig. 1 Oral (saliva) microbiota before and after feeding in all subjects. **a** Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis-based cladogram for oral microbiota in fasted compared with fed condition from all subjects for 16S rDNA sequence analysis of saliva samples. **b** Unifrac

representation of the beta diversity between fasted and fed conditions. A PERMDISP and a PERMANOVA test were performed with 999 permutations to assess the statistical significance of the difference between fasted and fed conditions in beta diversity PCoA analyses

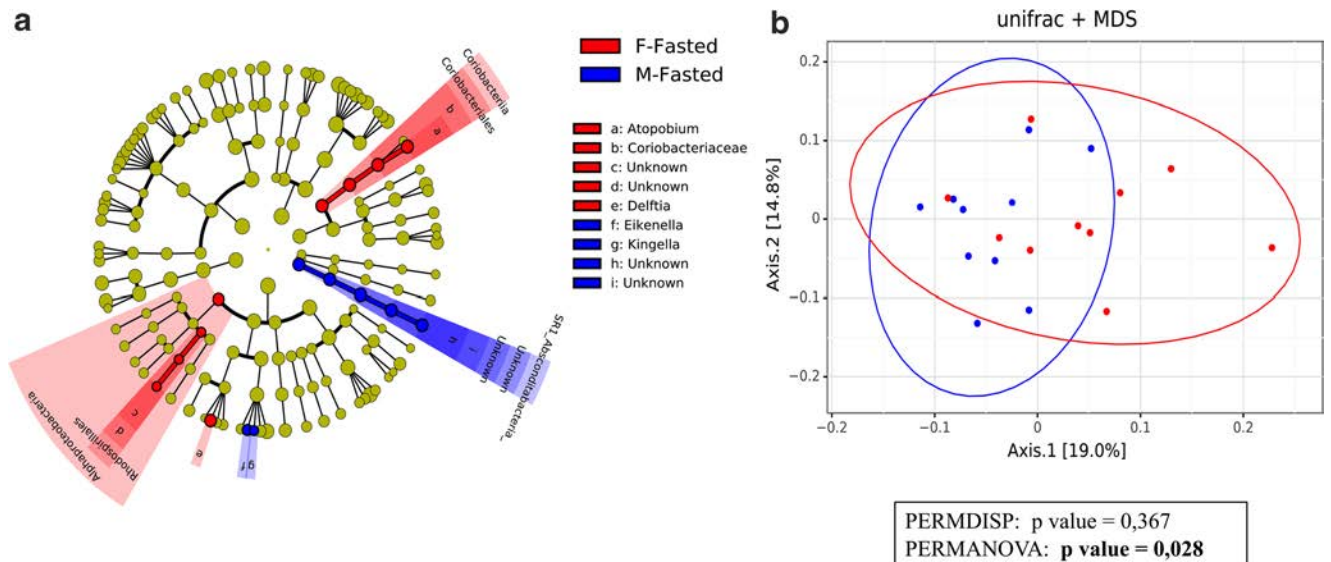


Fig. 2 Oral (saliva) microbiota in fasted condition in women compared with men subjects: **a** Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis-based cladogram for oral microbiota from fasted female saliva compared with fasted male saliva for 16S rDNA sequence analysis of saliva samples. LDA score 2.0 for cladograms. **b** Unifrac representation

of the beta diversity between fasted female and fasted male. A PERMDISP and a PERMANOVA test were performed with 999 permutations to assess the statistical significance of the difference between fasted female and fasted male in beta diversity PCoA analyses

and filled teeth) of the global cohort was 0.80 ± 0.92 and was not significantly different between men and women. Concerning the gingival status, the bleeding on probing (BOP) (1.33 ± 0.86 vs 1.41 ± 1.25 , $p = 0.87$) and plaque index (PI) (1.11 ± 1.05 vs 1.17 ± 0.79 , $p = 0.89$) were not significantly different between men and women (Table 1), which could reflect the similar number of brushings per day (2.11

± 0.33 vs 2.29 ± 0.43 , $p = 0.2927$) and time of brushing (in min) (1.78 ± 0.26 vs 1.90 ± 0.35 , $p = 0.11$) (Table 1). There was no diagnosis of periodontitis in the 2 groups. Two parameters were significantly higher in women: the frequency of dental checkups in the last 12 months (0.64 ± 0.28 vs 1.25 ± 0.56 , $p = 0.0111$) and the stress score (1.22 ± 0.44 vs 3.17 ± 1.91 , $p = 0.0031$) (Table 1).

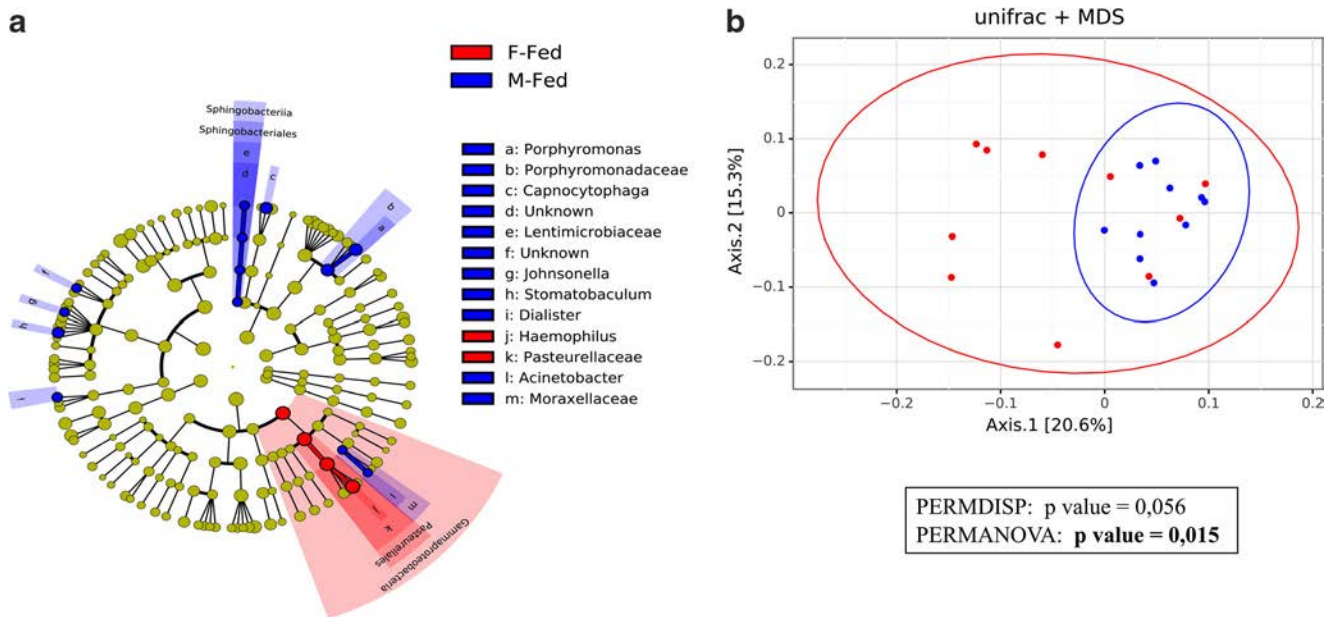


Fig. 3 Oral (saliva) microbiota in fed condition in women subjects compared with men subjects: **a** Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis-based cladogram for oral microbiota from fed female saliva compared with fed male saliva for 16S rDNA sequence analysis of saliva samples. LDA score 2.0 for cladograms. **b** Unifrac representation

of the beta diversity between fed female and fed male. A PERMDISP and a PERMANOVA test were performed with 999 permutations to assess the statistical significance of the difference between fed female and fed male in beta diversity PCoA analyses

Table 1 Clinical and oral parameters

	All subjects (<i>n</i> = 20)	Male (<i>n</i> = 10)	Female (<i>n</i> = 10)	<i>p</i> value (male vs female)
Age (years)	23.90 ± 2.14	23.67 ± 1.12	24.08 ± 2.60	0.8189
Weight (kg)	61.28 ± 12.42	72.33 ± 10.74	53.00 ± 4.51	< 0.0001 ***
Height (cm)	169.95 ± 9.03	178.00 ± 6.36	163.92 ± 4.91	0.0003 **
N° of brushing/day	2.21 ± 0.4	2.11 ± 0.33	2.29 ± 0.43	0.2927
Brushing time in min	1.84 ± 0.32	1.78 ± 0.26	1.90 ± 0.35	0.1060
Frequency of visits to dentist/years	0.99 ± 0.56	0.64 ± 0.28	1.25 ± 0.56	0.0111 *
DMF (decay, missed, and filed)	0.80 ± 0.92	0.78 ± 0.83	0.83 ± 0.98	0.80
Plaque index (PI)	0.85 ± 1.01	1 ± 1.12	0.75 ± 0.92	0.89
Bleeding on probing (BOP)	0.86 ± 1.52	0.89 ± 1.7	0.83 ± 1.40	0.87
Stress level on a scale from 1 to 10	2.33 ± 1.79	1.22 ± 0.44	3.17 ± 1.91	0.0031 *

Data as mean ± SD. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.0001, unpaired Mann-Whitney test

Biological analysis

To determine the biological status of saliva after feeding, we measured the level of different metabolites and enzymes following a 16-h fasting period and 2 h after feeding (Table 2). The results show that saliva-related parameters were decreased after feeding. This was highly significant for free fatty acids (FFA, 0.15 mmol/L ± 0.15 vs 0.07 mmol/L ± 0.07, *p* = 0.0078) and cholesterol (0.53 mmol/L ± 0.30 vs 0.15 mmol/L ± 0.14, *p* < 0.0001), as well as total saliva proteins (13.2 g/L ± 4.31 vs 9.02 g/L ± 6.98, *p* = 0.0168). Interestingly, saliva lipase levels also decreased after feeding (27.89 U/L ± 25.7 vs 12.28 U/L ± 4.85, *p* = 0.0126). As expected, the meal induced an increase in blood glucose (87.42 mg/dL ± 7.46 vs 110.71 mg/dL ± 21.82, *p* < 0.0001) (Table 2).

When investigating gender-related differences, the level of blood glucose was not different between men and women in the fasted state (88.00 mg/dL ± 6.38 vs 87.00 mg/dL ± 8.07, *p* = 0.9149) or in the fed state (102.44 mg/dL ± 14.03 vs 116.9 mg/dL ± 25, *p* = 0.1362) (Table 3). But as expected,

blood glucose increased after feeding for both men (88.00 mg/dL ± 6.38 vs 102.44 mg/dL ± 14.03, *p* = 0.0084) and women (87.00 mg/dL ± 8.07 vs 116.91 mg/dL ± 25, *p* = 0.0021).

Interestingly, men in the fasted state showed higher levels of cholesterol (0.71 mmol/L ± 0.26 vs 0.40 mmol/L ± 0.27, *p* = 0.0329), FFA (0.25 mmol/L ± 0.18 vs 0.08 mmol/L ± 0.06, *p* = 0.0049), and triglycerides (0.24 mmol/L ± 0.15 vs 0.09 mmol/L ± 0.04, *p* = 0.006) than women, but these differences were not seen in the fed state (Table 3).

Finally, saliva lipase (35.10 U/L ± 27.52 vs 12.97 U/L ± 4.29, *p* = 0.0484) and cholesterol levels (0.71 mmol/L ± 0.26 vs 0.12 mmol/L ± 0.073, *p* = 0.002) were decreased in the fed state only for men (Table 3).

Analysis of taxonomic composition of oral microbiota

We then analyzed the composition of the oral microbiota in both groups in the fasted and fed conditions. The alpha diversity of the oral microbiota was significantly higher in the fed

Table 2 Saliva and blood biological parameters in fasted compared with fed condition

Biological parameters	Fasted	Fed	<i>p</i> value
In saliva			
Amylase (U/L)	972.34 ± 418.57	968.38 ± 443.34	0.968
Lipase (U/L)	27.894 ± 25.71	12.28 ± 4.85	0.0126 *
Cholesterol (mmol/L)	0.53 ± 0.30	0.15 ± 0.14	< 0.0001 ***
Glucose (mmol/L)	0.03 ± 0.02	0.48 ± 1.79	0.3476
Total proteins (g/L)	13.20 ± 4.31	9.02 ± 6.98	0.0168 *
Triglycerides (mmol/L)	0.15 ± 0.12	0.11 ± 0.14	0.2282
Free fatty acids (FFA)(mmol/L)	0.15 ± 0.14	0.072 ± 0.079	0.0078 *
In blood			
Blood glucose (mg/dL)	87.42 ± 7.46	110.71 ± 21.82	< 0.0001 ***

Data as mean ± SD. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.0001. Unpaired Mann-Whitney test

than in the fasted state (58.99 ± 7.17 vs 63.27 ± 6.23 , $p = 0.0171$ for the Chao index) (Table 4). Similarly, the beta diversity was significantly different between fed and fasted states ($p = 0.029$) (Fig. 1b).

When looking at the relative abundance of bacterial species, the Streptococcaceae family was over-expressed in the fed condition ($24.56\% \pm 9.32$ vs $13.53\% \pm 7.47$, $p = 0.00055$) and represented the main part of the oral microbiota of all subjects after feeding. Also, some genera were significantly over-expressed in the fed condition, like *Oribacterium* ($2.14\% \pm 1.42$ vs $1.12\% \pm 0.04$, $p = 0.0123$) (Table 4).

These increases were at the expense of Prevotellaceae, the major family in the fasted state, that was decreased upon feeding ($34.45\% \pm 9.30$ vs $17.43\% \pm 9.03$, $p = 0.00055$) and especially the genus *Prevotella* 7 ($26.37\% \pm 8.62$ vs $13.10\% \pm 7.96$, $p = 0.00055$) (Table 4 and Fig. 1a).

When comparing the oral microbiota composition between genders, we noted that the microbiota alpha diversity in men in the fed condition (according to the Chao index) was significantly higher than in women, (2.58 ± 0.14 vs 2.30 ± 0.19 , $p = 0.0036$) (Table 5 and Fig. 2b). The beta diversity between gender in fasted ($p = 0.028$) and fed conditions ($p = 0.015$) were significantly different (Figs. 2b and 3b, respectively).

Interestingly, the relative abundances of bacterial species that were significantly different between genders in the fasted condition did not differ in the fed condition (Table 5).

In particular, in the fed condition, an increase of the relative abundance in the women was observed for the major family Pasteurellaceae ($12.925\% \pm 6.154$ vs $21.236\% \pm 10.220$, $p = 0.08$) and the genus *Haemophilus* ($12.271\% \pm 6.281$ vs $20.920\% \pm 9.998$, $p = 0.08$) (Table 5 and Fig. 3a). The genus *Capnocytophaga* ($1.545\% \pm 1.557$ vs $0.628\% \pm 0.552$, $p = 0.05$) was significantly more abundant in the male subjects (Table 5 and Fig. 3a).

In the fasted condition, the main difference between men and women was for the genus *Eikenella* ($0.084\% \pm 0.043$ vs $0.031\% \pm 0.053$, $p = 0.05$) which is more abundant in male subjects (Fig. 2a). In the cladogram comparing men and women in fasted and fed conditions (Figs. 2a and 3a), we identified bacteria which are signatures of both the male gender and the fed conditions: Lentimicrobiaceae and *Capnocytophaga* (belonging to the Bacteroidetes phylum) were overrepresented in the male salivary samples and could thus be part of a “male microbiota” signature. In a similar way, the genus *Haemophilus* from the Pasteurellaceae family was overrepresented in the female salivary samples after feeding and could be a signature of the female salivary microbiota.

Our study suggests that men have a distinct oral microbiota compared with women in fed or fasted conditions that could be linked to glycemic response after feeding. No significant correlations have been found between the ratio fed glycemia/ fasted glycemia (glycemic fold change) and oral microbiota

(Sup Fig. 1), but a significant and positive correlation has been found between the glycemic fold change and the lipase fold change in saliva (Sup Fig. 2).

Thus, we propose the identification and further study of specific oral bacteria to monitor the glycemic response.

Discussion

In this study, we have shown that in a cohort of men and women related in age and education, significant differences were observed in the salivary levels of some metabolites, enzymes, and bacterial species before and after feeding. Few articles have so far been published about metabolic and enzymatic activities in saliva. However, it has been shown that these parameters can be influenced by multiple factors: for example, a great disparity in the levels of some enzymes due to the simple fact of smoking has been observed [37]. Here we show differences in salivary cholesterol and triglycerides between males and females in fasted conditions but not in the fed state, as previously described [25]. Moreover, we observed major differences in cholesterol and in salivary lipase levels after feeding with a reduction by more than twofold of the lipase after feeding. Although a lipase from rat tongue hydrolyzing triglycerides to diglycerides and free fatty acids with an optimum pH of 4.5 to 5.4 has been shown [17] [18], this lingual lipase or LIPF is not expressed in the human tongue [48]. Thus, other lipases could be responsible for this lipase activity. It is known that the activity of different lipoprotein lipases (LPL) is regulated by insulin. For example, in adipose tissue, LPL concentration is higher after food intake [40]. However, in skeletal muscle and heart, lipoprotein lipase concentration has been reported to decline under these conditions. We show here that in saliva, decreased lipase concentrations are detected after feeding; we also show a linear correlation between the glycemic fold change and the lipase fold change in saliva, meaning that lipase concentration and glycaemia could be linked.

The significance of the salivary lipase levels we have shown here is not yet clear, but, as previously mentioned, it could be involved in fat taste sensitivity [33] and thus in appetite regulation.

We also found differences in triglycerides and cholesterol levels only in the fasted state between men and women. Salivary triglycerides have been shown to be correlated with levels of dental caries [44]. In the same way that decays are linked to specific bacterial species, we observed changes in the microbiota of men and women, with *Streptococcus* being more represented in men and *Haemophilus* in women. Sex-specific differences have also been reported in the salivary microbiota of caries-active children [36], and it would be interesting to investigate the origin and possibly a potential therapeutic utility of these differences. A relationship has

Table 3 Saliva and blood biological parameters between male and female in fed and fasted conditions

Biological Parameters	Fasted			Fed				
	Male (M) (n = 10)	Female (F) (n = 10)	p value (M vs F)	Male (n = 10)	Female (n = 10)	p value (M vs F)	p value fasting male vs fed male	p value fasting female vs fed female
Amylase (U/L)	792.14 ± 444.19	1107.50 ± 2343.30	0.1658	920.57 ± 523.04	1004.24 ± 377.1	0.6798	0.4989	0.3377
Lipase (U/L)	35.10 ± 27.52	22.49 ± 23.00	0.3554	12.97 ± 4.29	11.77 ± 5.14	0.5869	0.0484*	0.1532
Cholesterol (mmol/L)	0.71 ± 0.26	0.40 ± 0.27	0.0329*	0.12 ± 0.073	0.18 ± 0.17	0.3501	0.002**	0.0559
Glucose (mmol/L)	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.2933	1.412 ± 3.10	0.017 ± 0.009	0.1900	0.3650	0.3607
Total proteins (g/L)	13.83 ± 2.55	12.74 ± 5.12	0.5458	10.09 ± 7.38	8.23 ± 6.59	0.5611	0.1621	0.0672
Triglycerides (mmol/L)	0.24 ± 0.15	0.09 ± 0.04	0.0060**	0.17 ± 0.21	0.072 ± 0.041	0.1252	0.3422	0.4336
Free fatty acids (FFA) (mmol/L)	0.25 ± 0.18	0.08 ± 0.06	0.0049**	0.07 ± 0.06	0.073 ± 0.09	0.9021	0.055	0.4511
In blood								
Blood glucose (mg/dL)	88.00 ± 6.38	87.00 ± 8.07	0.9149	102.44 ± 14.03	116.9 ± 25	0.1362	0.0084**	0.0021**

Data as mean ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$. Unpaired Mann-Whitney test

previously been observed between the intestinal microbiota and nutritional status [11]. Firmicutes and Prevotellaceae enterotype were more abundant in diets high in carbohydrates or simple sugars (glucose and fructose), whereas Bacteroidetes were more present in diets rich in animal proteins. We have shown here, for the first time, similar correlations for the oral microbiota. Oral and gut microbiota are linked by a constant flow of ingested saliva, and this link had been shown in many digestive systemic diseases [29], suggesting the importance of the oral microbiota in local and systemic health. Since Bacteroidetes are also more common in the intestinal microbiota of obese individuals and those on high-fat diets [6, 35], the possible relationships between the oral microbiota and obesity-related pathologies may be of interest for diagnosis and therapeutic strategies, as already described for the gut microbiota [3, 4, 8, 47]. The microbiota is an indicator of the physiological state of a tissue or an organ. While each individual and each organ have a distinct microbial profile, it is of interest to observe changes in these microbiotas that could be characteristic of pathological states. The salivary microbiota is composed mainly of anaerobic bacteria [16]. In our studies, variations in several types of bacteria have been seen after feeding. In particular, we saw a decrease in the proportion of the phylum Bacteroidetes and an increase in the phylum Firmicutes.

In the literature, the Bacteroidetes and Firmicutes phyla have been principally studied in the intestinal microbiota. The phylum Bacteroidetes is absolutely necessary in the digestion of fibrous materials [45]. It also helps in the digestion of complex polysaccharides in the intestine. Most of these bacteria are anaerobic, and the intestinal flora changes with the modification of feeding. Bacteroidetes is underrepresented

in the intestinal flora of obese mice and humans, predisposed to suffer from type 2 diabetes [16], although is not yet known whether Bacteroidetes plays a beneficial or a detrimental role in this type of pathology. The other phylum that we have shown to be changed in oral microbiota following feeding is the phylum Firmicutes, containing gram-positive bacteria. Ley et al. [28] studied the intestinal microbiota and found similar results to ours on the oral microbiota. In both cases, the level of Firmicutes is much higher after feeding and may thus be implicated in obesity and obesity-related pathologies. These observations could be surprising since many bacteria found in the oral cavity are dependent on glucose for their growth. The hypothesis proposed by Goodson et al. [16] is that hyperglycemia perturbs the level of acidification and that these changes are beneficial for Firmicutes and detrimental for Bacteroidetes.

An important information extracted from our study and from the literature [41] is that the oral microbiota is less diversified in fasted condition than in fed condition, but this is not only due to the alimentation. In fact, bacterial diversity in saliva can be modified by a number of factors like the changes in pH, which have been shown to modify other microbiotas. These changes in oral microbiota show in our study an increase in *Streptococcus* which could be related to changes in sugar metabolism [34]. In fact, bacteria belonging to the genus *Streptococcus* have a remarkable ability to metabolize carbohydrates via fermentation, thereby generating acids as by-products [22]. Excessive acidification of the oral environment by aciduric species such as *Streptococcus mutans* is directly associated with the development of dental caries [22]. The acidosis of saliva could be link to gram negative bacteria; in our study, we see a

Table 4 Relative abundance (%) for taxonomic phyla, family and genera identified with significant differences in oral (saliva) microbiota (data as mean ± SD) in fasted and fed conditions

Relative abundance (%) in oral microbiota	Microbiota parameters	Fasted (All subjects n = 20)	Fed (All subjects n = 20)	p value (Fasted vs fed)	
	α-diversity by the Shannon index	2.44 ± 0.19	2.42 ± 0.22	0.8502	
	α-diversity by the Chao Index	58.99 ± 7.17	63.27 ± 6.23	0.0171*	
<i>Phyla</i>	<i>Actinobacteria</i>	4.67 ± 2.66	4.97 ± 2.10	0.6583	
	<i>Bacteroidetes</i>	38.93 ± 9.09	21.49 ± 9.09	0.00055**	
	<i>Firmicutes</i>	22.06 ± 7.96	33.21 ± 9.75	0.00123**	
	<i>Fusobacteria</i>	9.73 ± 3.53	9.39 ± 4.66	0.8262	
	<i>Proteobacteria</i>	24.02 ± 11.57	30.65 ± 12.91	0.1345	
	<i>(Absconditabacteri- a)</i>	0.3 ± 0.63	0.24 ± 0.54	0.76645	
	<i>Saccharibacteria</i>	0.04 ± 0.04	0.02 ± 0.02	0.0493*	
	<i>Spirochaetae</i>	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.03	0.176	
	<i>Family</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	0	0.02 ± 0.09	0.035*
		<i>Burkholderiaceae</i>	0.29 ± 0.29	0.7 ± 0.82	0.0419*
<i>Caulobacteraceae</i>		0.02 ± 0.05	0	0.0358*	
<i>Comamonadaceae</i>		0.31 ± 1.17	0.1 ± 0.15	0.48931	
<i>Peptostreptococcaceae</i>		0.53 ± 0.45	0.24 ± 0.24	0.0327*	
<i>Prevotellaceae</i>		34.45 ± 9.30	17.43 ± 9.03	0.00055**	
<i>Rhodobacteraceae</i>		0	0.08 ± 0.30	0.0228*	
<i>Sphingomonadaceae</i>		0	0.01 ± 0.04	0.1345	
<i>Streptococcaceae</i>		13.53 ± 7.47	24.56 ± 9.32	0.00055**	
<i>Genera</i>		<i>Actinobacillus</i>	0.03 ± 0.07	0.16 ± 0.30	0.0910*
	<i>Aggregatibacter</i>	0.09 ± 0.07	0.27 ± 0.35	0.0377*	
	<i>Bacteroides</i>	0	0.02 ± 0.09	0.035*	
	<i>Bergeyella</i>	0.29 ± 0.24	0.47 ± 0.29	0.0305*	
	<i>Butyrivibrio 2</i>	0.17 ± 0.17	0.03 ± 0.03	0.001*	
	<i>Lautropia</i>	0.29 ± 0.29	0.7 ± 0.82	0.040*	
	<i>Oribacterium</i>	1.12 ± 0.04	2.14 ± 1.42	0.0123*	
	<i>Paracoccus</i>	0	0.08 ± 0.30	0.022*	
	<i>Prevotella</i>	5.06 ± 2.79	2.62 ± 1.98	0.00055**	
	<i>Prevotella 6</i>	1.32 ± 1.24	0.56 ± 0.55	0.00183	
	<i>Prevotella 7</i>	26.37 ± 8.62	13.10 ± 7.96	< 0.0001***/ 0.00055	
	<i>Prevotella 9</i>	0	0.03 ± 0.07	0.0269	
	<i>Streptococcus</i>	13.53 ± 7.47	24.56 ± 9.32	0.00055	
	<i>Sphingomonas</i>	0	0.01 ± 0.04	0.129	

Data as mean ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001. Unpaired Mann-Whitney test

decrease after feeding for *Porphyromonas*, and this variability is similar to that observed in the intestinal microbiota. Finally, differences could be observed in saliva microbiota between men and women in fasted but even more in fed condition where *Porphyromonas* and *Capnocytophaga* were overrepresented in the male salivary samples compared with female saliva like the literature suggests [7]. Another important factor involved in these gender differences could be linked to the effect of sex hormones [26]

[14]. In fact, recent studies indicate that the protective effect of estradiol depends on the estrogen receptor subtype and the specific tissue compartment involved in the bacterial insult, suggesting that tissue-specific expression of particular sex steroid receptors contributes to the susceptibility to bacterial infections. Furthermore, this gender bias also depends on the effects of sex hormones on specific bacterial species [14]. The characteristics of *Capnocytophaga* bacteria are their strictly fermentative metabolism, dependent on

Table 5 Relative abundance (%) for taxonomic phyla, family and genera identified with significant differences in oral (saliva) microbiota (data as mean ± SD) between Male and Female in the two conditions fasted and fed

Microbiota parameters		Fasted		p value (M vs F)	Fed		p value (M vs F)	p value Fasting M vs fed M	p value Fasting F vs Fed F	
		Male(n = 10)	Female (n = 10)		Male (n = 10)	Female (n = 10)				
Relative abundance (%) in oral microbiota	α-diversity by the Shannon index	60.57 ± 6.13	57.61 ± 8.11	0.56	65.51 ± 5.16	62.02 ± 6.71	0.2935	0.063*	0.19	
	α-diversity by the Chao index	2.45 ± 0.22	2.43 ± 0.18	0.86	2.58 ± 0.14	2.30 ± 0.19	0.0036**	0.16	0.11	
Phyla	<i>Actinobacteria</i>	4.54 ± 2.18	4.77 ± 2.96	0.999	4.60 ± 1.96	5.27 ± 2.15	0.602	0.99	0.78	
	<i>Bacteroidetes</i>	42.37 ± 7.60	35.84 ± 9.07	0.265	24.18 ± 8.15	19.30 ± 9.15	0.353	0.0072**	0.021*	
	<i>Firmicutes</i>	23.86 ± 8.51	20.43 ± 7.12	0.54	35.98 ± 10.53	30.95 ± 8.51	0.37	0.144	0.023*	
	<i>Fusobacteria</i>	8.77 ± 2.86	10.60 ± 2.86	0.27	10.52 ± 4.88	8.47 ± 4.28	0.353	0.66	0.411	
	<i>Proteobacteria</i>	19.80 ± 11.90	27.82 ± 9.86	0.27	24.18 ± 9.01	35.95 ± 12.90	0.134	0.69	0.43	
	<i>SRI (Absconditabacteria)</i>	0.62 ± 0.81	0.01 ± 0.02	0.19	0.49 ± 0.75	0.03 ± 0.03	0.190	0.87	0.39	
	<i>Saccharibacteria</i>	0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.04	0.65	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.513	0.79	0.08	
	<i>Spirochaetae</i>	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.56	0.03 ± 0.04	0.01 ± 0.02	0.134	0.58	0.78	
	Family	<i>Coriobacteriaceae</i>	0.203 ± 1.61	0.790 ± 0.003	0.17	0.293 ± 0.292	0.168 ± 0.124	0.285	0.69	0.023*
		<i>Lentimicrobiaceae</i>	0.011 ± 0.010	0.006 ± 0.014	0.26	0.058 ± 0.063	0.014 ± 0.030	0.009**	0.080	0.78
<i>Moraxellaceae</i>		0.006 ± 0.007	0.012 ± 0.020	0.52	0.031 ± 0.062	0.005 ± 0.006	0.05*	0.55	0.78	
<i>Pasteurellaceae</i>		9.864 ± 7.024	14.825 ± 9.416	0.413	12.925 ± 6.154	21.236 ± 10.220	0.08	0.62	0.39	
Genera	<i>Porphyromonadaceae</i>	4.781 ± 2.690	2.774 ± 3.019	0.27	3.267 ± 1.709	1.871 ± 1.451	0.08	0.57	0.79	
	<i>Acinetobacter</i>	0.004 ± 0.006	0.009 ± 0.021	0.95	0.025 ± 0.052	0.003 ± 0.005	0.08	0.55	1	
	<i>Atopobium</i>	0.200 ± 0.159	0.782 ± 1.043	0.17	0.285 ± 0.292	0.161 ± 0.119	0.28	0.69	0.023*	
	<i>Capnocytophaga</i>	1.076 ± 0.615	0.608 ± 0.390	0.26	1.545 ± 1.557	0.628 ± 0.552	0.05*	0.90	0.78	
	<i>Delftia</i>	0.004 ± 0.009	0.483 ± 1.531	0.19	0.051 ± 0.075	0.044 ± 0.015	0.26	0.04*	0.39	
	<i>Dialister</i>	0.093 ± 0.071	0.092 ± 0.083	/ 0.99	0.115 ± 0.108	0.071 ± 0.071	0.05*	0.97	0.21	
	<i>Eikenella</i>	0.084 ± 0.043	0.031 ± 0.053	0.05*	0.063 ± 0.050	0.053 ± 0.081	0.39	0.62	0.43	
	<i>Haemophilus</i>	9.696 ± 7.089	14.70 ± 9.346	0.36	12.271 ± 6.281	20.920 ± 9.998	0.08	0.62	0.39	
	<i>Johnsonella</i>	0.032 ± 0.044	0.014 ± 0.032	0.197	0.059 ± 0.078	0.020 ± 0.040	0.05	0.62	0.43	
	<i>Kingella</i>	0.018 ± 0.026	0.001 ± 0.003	0.197	0.015 ± 0.023	0.004 ± 0.010	0.26	0.79	0.78	
	<i>Porphyromonas</i>	4.637 ± 2.704	2.575 ± 3.092	0.244	2.976 ± 1.709	1.698 ± 1.515	0.08	0.57	0.78	
	<i>Stomatobaculum</i>	0.744 ± 0.520	0.539 ± 0.526	0.250	0.746 ± 0.371	0.360 ± 0.258	0.05	0.94	0.78	

Data as mean ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001. Unpaired Mann-Whitney test

the presence of CO², the presence of benzidine-reactive components, and the production of acetic and succinic acids [13]. So, to conclude, during feeding, there is a drop in CO² pressure in the oral cavity leading to an increase in *Streptococcus* and therefore an increase in oral acidity as well as a decrease in Prevotellaceae.

Thus, although some of these changes in microbiota may be directly due to the different degrees of glycaemia, a number of other factors, such as pH, hormonal changes, or other metabolic changes, may also be influencing the changes seen in microbiota. Regardless of the explanation for these findings, they reinforce the idea that changes in metabolic and microbiological biomarkers in saliva could be useful indicators of systemic status [23].

To go further, biocaptors incorporated in teeth and measuring the levels of these markers could be the next approach to continuously monitor metabolic status. In the future, it may also be possible to develop biosensors to quantify enzymes or bacteria present in oral cavity. Mannoor et al. proposed a first version of a “connected tooth” [31]. These authors reported the “graft” on a tooth of a “nanosensor” in graphene exploiting the existence of antimicrobial peptides (antimicrobial peptides or (AMPs)) that exist in nature to detect certain species such as *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, or *Staphylococcus aureus*. They showed that it is possible to detect the binding of a single bacterium on a sensor, giving support to the idea that biocaptors incorporated in teeth could be eventually used to continuously monitor disease states. This would support the

proposition by David Wong that “oral fluid (saliva), the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance” [51].

In summary, we have conducted a short and primary pilot study showing that in the fasted state, cholesterol, triglyceride, and free fatty acid levels in saliva are different between male and female subjects. These biological parameters also vary significantly with the degree of glycemia (fasting vs fed), as do levels of certain bacterial species. This study confirms the growing interest in saliva as a biological fluid to explore the differences between men and women which we think may be important in future “personalized medicine” treatments.

Acknowledgements We would also like to show our gratitude to the technical staff of *Vaiomer* for sequencing and taxonomic analysis for oral microbiota and *Anexplo* platform for biochemistry analysis of saliva and blood.

We thank Dr. Adrian Minty for his comments for editing the English.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interests.

References

1. Ansari-Pour N, Jafari M (2019) Why, when and how to adjust your P values? *Cell J* 20(4):604–607
2. Beale AL, Kaye DM, Marques FZ (2019) The role of the gut microbiome in sex differences in arterial pressure. *Biol Sex Differ* 10:22. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0236-8>
3. Blasco-Baque V, Coupe B, Fabre A, Handgraaf S, Gourdy P, Amal JF, Courtney M, Schuster-Klein C, Guardiola B, Terce F, Burcelin R, Serino M (2017) Associations between hepatic miRNA expression, liver triacylglycerols and gut microbiota during metabolic adaptation to high-fat diet in mice. *Diabetologia* 60:690–700. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4209-3>
4. Blasco-Baque V, Garidou L, Pomie C, Escoula Q, Loubieres P, Le Gall-David S, Lemaître M, Nicolas S, Klopp P, Waget A, Azalbert V, Colom A, Bonneure-Mallet M, Kemoun P, Serino M, Burcelin R (2017) Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut* 66:872–885. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309897>
5. Bollero P, Di Renzo L, Franco R, Rampello T, Pujia A, Merra G, De Lorenzo A, Docimo R (2017) Effects of new probiotic mouthwash in patients with diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21:5827–5836. https://doi.org/10.26355/eurrev_201712_14031
6. Burcelin R, Serino M, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J (2011) Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol* 48:257–273. <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0333-6>
7. Champagne NYC, Oetjen JA, Riché EL, Beck JD, Offenbacher S (2009) Gender differences in systemic inflammation and atheroma formation following *Porphyromonas Gingivalis* infection in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *J Periodontol Res* 44(5): 569–577
8. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM (2007) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50:2374–2383. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0791-0>
9. Chan EC, McLaughlin R (2000) Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* 15:1–9
10. Clegg DJ, Mauvais-Jarvis F (2018) An integrated view of sex differences in metabolic physiology and disease. *Mol Metab* 15:1–2. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.06.011>
11. de Toro-Martin J, Arsenault BJ, Despres JP, Vohl MC (2017) Precision nutrition: a review of personalized nutritional approaches for the prevention and management of metabolic syndrome. *Nutrients* 9. <https://doi.org/10.3390/nu9080913>
12. Drazewski D, Grzymislawska M, Korybalska K, Czepulis N, Grzymislawski M, Witowski J, Surdacka A (2017) Oral health status of patients with Lysosomal storage diseases in Poland. *Int J Environ Res Public Health* 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14030281>
13. Leadbetter ER, Holt SC, Socransky SS (1979) Capnocytophaga: new genus of gram-negative gliding Bacteria. I. General characteristics, taxonomic considerations and significance. *Arch Microbiol* 122(1):9–16. <https://doi.org/10.1007/BF00408040>
14. Edgar Ricardo Vázquez-Martínez EG-G, Camacho-Arroyo I, González-Pedrajo B (2018) Sexual dimorphism in bacterial infections. *Biol Sex Differ* 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0187-5>
15. Escudié FAL, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G (2018) FROGS: find, rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
16. Goodson JM, Shi P, Hasturk H, Yaskell T, Vargas J, Song X, Cugini M, Barake R, Alsmadi O, Al-Mutawa S, Ariga J, Soparkar P, Behbehani J, Behbehani K (2017) The salivary microbiome is altered in the presence of a high salivary glucose concentration. *PLoS One* 35:9–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170437>
17. Hamosh MGD, Hamosh P (1979) Rat lingual lipase. Characteristics of enzyme activity. *J Biol Chem* 254(23):12121–12125
18. Hamosh M, Scow RO (1973) Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *J Clin Invest* 52:88–95. <https://doi.org/10.1172/JCI107177>
19. Hodes GE, Epperson CN (2019) Sex differences in vulnerability and resilience to stress across the life span. *Biol Psychiatry* 86:421–432. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.028>
20. Holde GE, Oscarson N, Trovik TA, Tillberg A, Jonsson B (2017) Periodontitis prevalence and severity in adults: a cross-sectional study in Norwegian circumpolar communities. *J Periodontol* 88: 1–17. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170164>
21. Huebschmann AG, Huxley RR, Kohrt WM, Zeitler P, Regensteiner JG, Reusch JEB (2019) Sex differences in the burden of type 2 diabetes and cardiovascular risk across the life course. *Diabetologia* 62:1761–1772. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4939-5>
22. Abranches LZJ, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA (2018) Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr* (5):10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018>
23. Janice M, Yoshizawa CAS, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DTW (2013) Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev* 26(4):781–791
24. Kahrstrom CT, Pariente N, Weiss U (2016) Intestinal microbiota in health and disease. *Nature* 535:47. <https://doi.org/10.1038/535047a>
25. Karjalainen S, Sewon L, Soderling E, Larsson B, Johansson I, Simell O, Lapinleimu H, Seppanen R (1997) Salivary cholesterol of healthy adults in relation to serum cholesterol concentration and

- oral health. *J Dent Res* 76:1637–1643. <https://doi.org/10.1177/00220345970760100401>
26. Khaled Hamden SC, Boujbiha MA, Lajmi S, Aloulou D, Kchaou D, Elfeki A (2008) Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: protective effect of 17 Beta-estradiol. *Steroids* 73(5):495–501. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.12.026>
 27. Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M (2005) Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* 20:244–252. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00225.x>
 28. Ley REBF, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31):11070–11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>
 29. Li BGY, Cheng L, Zeng B, Yu J, Peng X, Zhao J, Li W, Ren B, Li M, Wei H, Zhou X (2019) Oral bacteria colonize and compete with gut microbiota in gnotobiotic mice. *Int J Oral Sci* 11:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0043-9>
 30. Madonna R, Balistreri CR, De Rosa S, Muscoli S, Selvaggio S, Selvaggio G, Ferdinandy P, De Caterina R (2019) Impact of sex differences and diabetes on coronary atherosclerosis and ischemic heart disease. *J Clin med* 8doi. <https://doi.org/10.3390/jcm8010098>
 31. Mannoor MS, Tao H, Clayton JD, Sengupta A, Kaplan DL, Naik RR, Verma N, Omenetto FG, McAlpine MC (2012) Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. *Nat Commun* 3:763. <https://doi.org/10.1038/ncomms1767>
 32. Minty M, Canceill T, Le S, Dubois P, Amestoy O, Loubieres P, Christensen JE, Champion C, Azalbert V, Grasset E, Hardy S, Loubes JM, Mallet JP, Terce F, Vergnes JN, Burcelin R, Serino M, Diemer F, Blasco-Baque V (2018) Oral health and microbiota status in professional rugby players: a case-control study. *J Dent* 79: 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.10.001>
 33. Morzel M, Truntzer C, Neyraud E, Brignot H, Ducoroy P, Lucchi G, Canlet C, Gaillard S, Nicod F, Nicklaus S, Peretti N, Feron G (2017) Associations between food consumption patterns and saliva composition: specificities of eating difficulties children. *Physiol Behav* 173:116–123. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.005>
 34. Nicholas S, Jakubovics SAY, Rickard AH (2014) Community interactions of oral streptococci. *Adv Appl Microbiol* 87:43–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800261-2.00002-5>
 35. Nicolas S, Blasco-Baque V, Fournel A, Gilleron J, Klopp P, Waget A, Ceppo F, Marlin A, Padmanabhan R, Iacovoni JS, Terce F, Cani PD, Tanti JF, Burcelin R, Knauf C, Cormont M, Serino M (2017) Transfer of dysbiotic gut microbiota has beneficial effects on host liver metabolism. *Mol Syst Biol* 13:921. <https://doi.org/10.15252/msb.20167356>
 36. Ortiz S, Herman E, Lyashenko C, Purcell A, Raslan K, Khor B, Snow M, Forsyth A, Choi D, Maier T, Machida CA (2019) Sex-specific differences in the salivary microbiome of caries-active children. *J Oral Microbiol* 11:1653124. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1653124>
 37. Palmerini CA, Saccardi C, Ferracci F, Arienti S (2011) Lipid patterns in the saliva of smoking young adults. *Hum Exp Toxicol* 30: 1482–1488. <https://doi.org/10.1177/0960327111398672>
 38. Pedersen ASC, Proctor GB, Carpenter GH (2018) Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. *Oral Dis* 24:1399–1416. <https://doi.org/10.1111/odi.12867>
 39. Redekop WK, Mladsi D (2013) The faces of personalized medicine: a framework for understanding its meaning and scope. *Value Health* 16:S4–S9. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2013.06.005>
 40. Robinson DS, Speake BK (1989) Role of insulin and other hormones in the control of lipoprotein lipase activity. *Biochem Soc Trans* 17:40–42. <https://doi.org/10.1042/bst0170040>
 41. Sayaka Katagiri TS, Tohara H, Yamaguchi K, Hara K, Nakagawa K, Komatsu K, Watanabe K, Ohsugi Y, Maekawa S, Iwata T (2019) Re-initiation of oral food intake following enteral nutrition alters oral and gut microbiota communities. *Front Cell Infect Microbiol* 9:434. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00434>
 42. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12:R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
 43. Snell DM, Turner JMA (2018) Sex chromosome effects on male-female differences in mammals. *Curr Biol* 28:R1313–R1324. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.018>
 44. Subramaniam P, Sharma A, Kaje K (2015) Association of salivary triglycerides and cholesterol with dental caries in children with type 1 diabetes mellitus. *Spec Care Dentist* 35:120–122. <https://doi.org/10.1111/scd.12097>
 45. Thomas FHJ, Rebuffet E, Czjzek M, Michel G (2011) Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Front Microbiol* 30. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>
 46. Vari R, Scazzocchio B, D'Amore A, Giovannini C, Gessani S, Masella R (2016) Gender-related differences in lifestyle may affect health status. *Ann Ist Super Sanita* 52:158–166. https://doi.org/10.4415/ANN_16_02_06
 47. Villanueva-Millan MJ, Perez-Matute P, Oteo JA (2015) Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. *J Physiol Biochem* 71:509–525. <https://doi.org/10.1007/s13105-015-0390-3>
 48. Voigt N, Stein J, Galindo MM, Dunkel A, Raguse JD, Meyerhof W, Hofmann T, Behrens M (2014) The role of lipolysis in human olfactory fat perception. *J Lipid Res* 55:870–882. <https://doi.org/10.1194/jlr.M046029>
 49. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gotsche PC, Vandenbroucke JP, Initiative S (2014) The strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg* 12:1495–1499. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.07.013>
 50. W.M M (2014) Definitions of quality of life: what has happened and how to move on. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 20(3):167–180. doi: <https://doi.org/10.1310/sci2003-167>
 51. Wong DT (2006) Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer 'oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance'. *Expert Rev Mol Diagn* 6:267–272. <https://doi.org/10.1586/14737159.6.3.267>
 52. Zaura E BB, Teixeira de Mattos MJ, Buijs MJ, Caspers MP, Rashid MU, Weintraub A, Nord CE, Savell A, Hu Y, Coates AR, Hubank M, Spratt DA, Wilson M, Keijser BJ, Crielaard W. (2015) Same Exposure but Two Radically Different Responses to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome versus Long-Term Microbial Shifts in Feces. *mbio*

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Oral microbiota-induced periodontitis: a new risk factor of metabolic diseases

Matthieu Minty^{1,2,3} · Thibault Canceil^{2,3} · Matteo Serino⁴ · Remy Burcelin^{1,2,3} · François Tercé^{1,2,3} · Vincent Blasco-Baque^{1,2,3,5}

Published online: 18 November 2019

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

It has recently become evident that the periodontium (gingiva, desmodontal ligament, cementum and alveolar bone) and the associated microbiota play a pivotal role in regulating human health and diseases. The oral cavity is the second largest microbiota in the body with around 500 different bacterial species identified today. When disruption of oral cavity and dysbiosis occur, the proportion of strict anaerobic Gram-negative bacteria is then increased. Patients with periodontitis present 27 to 53% more risk to develop diabetes than the control population suggesting that periodontitis is an aggravating factor in the incidence of diabetes. Moreover, dysbiosis of oral microbiota is involved in both periodontal and metabolic disorders (cardiovascular diseases, dyslipidaemia ...). The oral diabetic dysbiosis is characterized by a specific bacteria *Porphyromonas*, which is highly expressed in periodontal diseases and could exacerbate insulin resistance. In this review, we will address the nature of the oral microbiota and how it affects systemic pathologies with a bidirectional interaction. We also propose that using prebiotics like *Akkermansia muciniphila* may influence oral microbiota as novel therapeutic strategies. The discovery of the implication of oral microbiota for the control of metabolic diseases could be a new way for personalized medicine.

Keywords Oral microbiota · Periodontitis · Metabolic diseases · Dysbiosis

1 Introduction

Many studies suggest a strong epidemiologic association between metabolic diseases and oral infection, such as periodontal disease [1–4], which is named as the sixth complication of diabetes mellitus [5] [6]. Periodontitis is an oral and chronic

multifactorial infection characterized by an inflammatory reaction associated with a dysbiosis of oral microbiota. The disruption of oral microbiota is dominated by Gram-negative bacteria in the periodontal microenvironment [7, 8]. This dysbiosis of oral microbiota induced an inflammation and a loss of both soft and hard tissues of the periodontium (e.g. the periodontal tissues) that protect the roots of the tooth and anchor them to the jaws. Most pathogens involved in periodontitis have been identified so far, and many of them are also known to be involved in metabolic diseases. Based on this aspect, Saito et al. hypothesized that the oral pathogens could contribute to the development of obesity with the translocation of bacteria and bacterial metafactors, such as Lipopolysaccharide (LPS), inducing endotoxemia [9]. LPS release in systemic circulation could target the metabolic organs such as liver, lung, adipose tissue, skeletal muscle and heart [10]. The presence of bacterial antigen is able to initiate an inflammatory reaction worsening the metabolic impairments [11].

The link through which a dysbiosis of oral microbiota contributes to metabolic diseases will be discussed in this review. The oral microbiota is linked to a cross-talk between local and systemic immune cells and low grade inflammatory status in

Matthieu Minty and Thibault Canceil contributed equally to this work.

✉ Vincent Blasco-Baque
vincent.blasco@inserm.fr

¹ INSERM U1048, F-31432 Toulouse, France, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), F-31432 Toulouse, France

² Université Paul Sabatier III (UPS), F-31432 Toulouse, France

³ CHU Toulouse, Service d'Odontologie Toulouse, F-3100 Toulouse, France

⁴ INSERM, INRA, ENVT, UPS, IRSD, Université de Toulouse, 31024 Toulouse, France

⁵ INSERM UMR1048-I2MC Team 2 « Intestinal Risk Factors, Diabetes and Dyslipidemia » Building L4, 1st floor, Hospital of Rangueil 1, Avenue Jean Poulhès, 84225 31432 Toulouse Cedex 4 Lab, BP, France

metabolic organs characterizing insulin resistance and obesity [11, 12]. The identification of responsible oral bacteria is currently in process and could open new therapeutic strategies for the prevention and treatment of metabolic patients. Altogether, the discovery of the implication of oral microbiota for the control of metabolic disease is promising in the development of new paradigm for medical team.

2 Periodontal tissue and periodontitis

2.1 Periodontal tissues

The periodontium consists of four tissues: gingiva, desmodontal ligament, cementum and alveolar bone (Fig.1). The first two are soft tissues while the next two are hard tissues. This is a first difficulty the organism has to manage to protect these structures or even regenerate them: tissue and cell competitions are complex and the first colonizer of the root surface will condition the type of healing [13]. The four structures can be distinguished anatomically: the gum composes the superficial periodontium while the other three constitute the deep periodontium [14]. The gingiva is a keratinized tissue with an underlying connective tissue which is rich in collagen fibers and whose function is to protect the other periodontal tissues [15]. Indeed, it ensures a mechanical barrier against bacteria and oral fluids but it is also rich in defense cells that may rapidly develop an immune reaction when an aggression occurs [14]. The junction between the gum and the deep periodontium tissues is ensured by a sulcular epithelium next to the amelocementary junction of the tooth. This epithelium is hermetic under physiological conditions: it prevents the passage of elements – such as bacteria – from the buccal environment to the supporting tissues. Above it, there is a small space, called the sulcus, between the

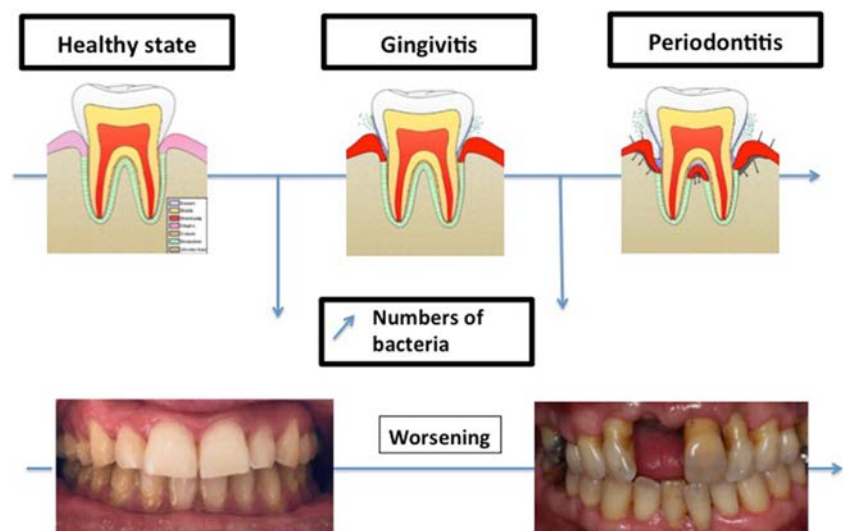
tooth and the free gingiva. A gingival fluid, composed of cellular debris, microorganisms and other electrochemical buccal elements such as ions, accumulates in this space [16]. By mixing with the saliva flow, this fluid is evacuated and allows the elimination of part of the waste discharged by the gum cells and the sulcular epithelium. Under physiological conditions, the presence of this attachment system of the soft tissues to the tooth is sufficient to protect the deep periodontium tissues.

During genesis of the dental organ, cementum is formed on the surface of the root with the particularity of having acellular zones in the occlusal direction (primary cementum) and cellular zones in the apical direction (secondary cementum). The primary tissue is built before tooth eruption while the other is formed after the eruption. Indeed, cementum deposition, which is mediated by cementoblasts, continues throughout life as long as the tooth does not have occlusal contacts with an antagonist [17]. It is mainly composed of a mineralized collagen extra-cellular matrix but it also contains other proteins such as the cementum attachment protein (CAP) or the cementum-derived growth factor (CGF) [17].

Desmodontal fibers are attached to the cementum, forming the so-called Sharpey fibers essentially on acellular cementum. This ligament is innervated and vascularized unlike the cementum, which makes it responsible for peridental proprioception in the alveolus and for providing the elements necessary for cementoblast function. The desmodont is composed of an extracellular matrix in which are found all ligament cells (fibroblasts, immune cells ...), fibers, vessels and nerves. The fibers that attach on one side to the tooth are anchored on the other side in the alveolar bone, which enables the whole structure to transmit occlusal forces from the tooth to the surrounding bone [18].

Alveolar bone is the name given to the specific part of the jaw that supports dental organs. It is common to consider that

Fig. 1 Schematic representation of the progression of periodontal diseases. The different steps of periodontal diseases are shown with associated clinical pictures



this bone “lives and dies” with the tooth, i.e. it forms during tooth building and eruption but it also resorbs after tooth loss [19]. This mechanism is explained by the destruction of the ligament when a tooth is extracted. Vascularization is no longer sufficient on the alveolar socket and soft tissue cells are more able than osteoblasts to proliferate and to invade the healing site [20]. In a physiologic state, alveolar bone is composed of an external cortical zone and an internal trabecular part. Like all other bones, it undergoes phenomena of renewal throughout life through a succession of apposition-resorption processes. All of this is mediated by specific cells, the osteoclasts for tissue resorption and the osteoblasts for matrix deposition [9]. Once these osteoblasts are surrounded by a mineralized matrix, they acquire a more quiescent phenotype and become osteocytes. They nevertheless conserve some of their initial properties of slight matrix mineralization and resorption. The bone skeleton is mainly composed of calcium phosphate crystals, collagen fibers and bone matrix proteins (osteopontin, osteonectin...) [21].

2.2 Periodontal diseases

In the mouth, hours after hours, the oral microbiota lies around and develops on the dental and mucosal surfaces (Fig.1) a specific biofilm which increases Gram-negative bacteria developing an oral dysbiosis. The microorganisms thus create an ecosystem in which all cells develop by taking advantage of the relationships they have with others [22]. Brushing teeth several times a day will, among other things, disrupt this dysbiosis and cause the bacteria renewal in the mouth. Under certain conditions, particularly in areas where saliva, rich in electrolytes (Phosphorus, Calcium), accumulates, biofilm mineralization can be initiated by dysbiotic microbiota [22]. This oral dysbiosis included in biofilm is on the surfaces of the teeth along the collar, i.e. at the junction between dental and gum tissues. Biofilm continues to form on the surface of the scale and self mineralizes, which tends to increase its volume. Brushing does not remove these tartaric deposits, so the intervention of a dental surgeon is necessary to perform a conventional scaling procedure. The accumulation of dysbiotic microbiota in tartaric deposits in an uncontrolled and prolonged manner, positively induces a gingival inflammatory reaction called gingivitis in the early stages of periodontitis (Fig.1) [23].

The retention of dysbiotic oral microbiota on the contact of periodontal tissues is the first step for the development of periodontitis. The bacteria infiltrate the tissues and create periodontal pockets associated with inflammation and bleeding (Fig.1) [24]. The disease leads to a progressive destruction of the entire attachment system, leading to tooth mobility in advanced stages and eventually to the potential loss of the

tooth. The periodontitis is aggravated in metabolic patients as shown in the picture of the Fig. 1.

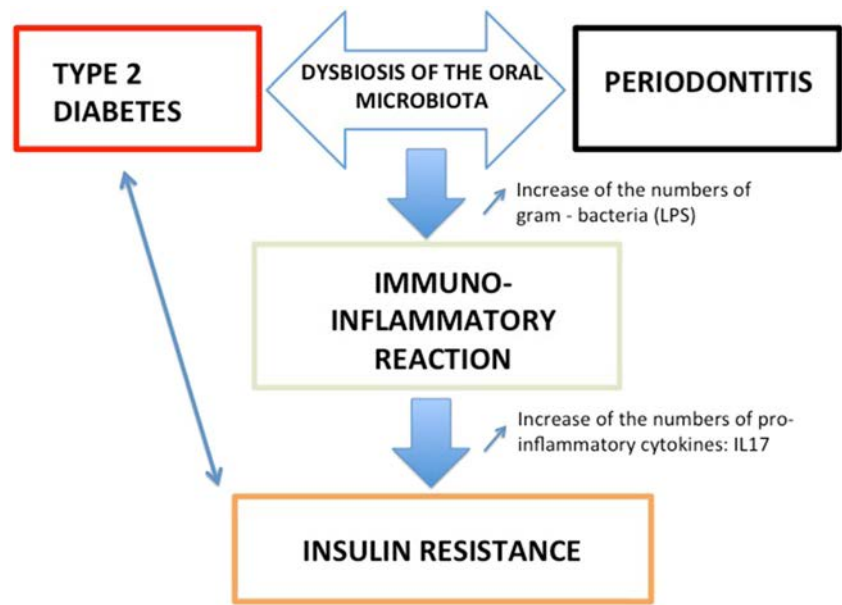
The bacterial challenging of Gram- bacteria in mouth and the evolution of the inflammatory process are largely described, but the impact of periodontitis on systemic health has to be clarified. Indeed, periodontitis are immune-infectious diseases that are caused by an imbalance between the bacterial etiologic factor and the host immune defenses [25]. We can hypothesize that some specific Gram-negative bacteria such as *Porphyromonas gingivalis*, attack periodontal tissues inducing local inflammation and could target the metabolic organs through a translocation [26] (Fig.2).

3 Description of oral and periodontal microbiota

The oral cavity is the second largest microbiota in the body with around 500 different bacterial species identified today [27]. Its acquisition occurs from the first minutes of life, in contact with microbiota from the skin, vagina and mouth of the mother [28]. The first bacteria to colonize the mouth are facultative anaerobic bacteria of the *Streptococcus* and *Actinomyces* genera, coming from contact with the microbiota of the mother. Strict anaerobic bacteria such as the genus *Veillonellae* and the phylum *Fusobacteria* colonize the oral cavity in a second step [29] (Fig.3).

The composition of the oral microbiota varies according to the different life events: dietary diversification, hormonal changes (puberty and menstrual period), taking drugs including antibiotics and of course, the age [30]. The oral microbiota has many beneficial effects for the host, contributing in particular to the protection against pure pathogens, but also for the development and education of the local and systemic immune system. These functions are possible thanks to a qualitative and quantitative balance between the different bacteria within the microbiota, called eubiose, compatible with good health. On the other hand, the loss of equilibrium within the microbiota, called dysbiosis with a decreased diversity, is one of the predisposing factors for local pathologies such as caries or periodontitis, which can also influence general pathologies, as presented below [24]. Another source of modification of the oral microbiota is the modification of equilibrium of systemic health. This microbiota is unique because it combines planktonic bacteria and biofilm bacteria on teeth included in an exo-polysaccharide matrix. During disruption and dysbiosis, the proportion of strict anaerobic Gram-negative bacteria such as “rods” or bacilli, like the genera *Fusobacterium*, *Porphyromonas* or *Prevotella*, is increased in oral cavity [22]. The dysbiosis of this oral microbiota is associated with systemic disorders like metabolic disorders [31].

Fig. 2 Bidirectional link and explanation between type 2 diabetes and periodontal diseases. Type 2 diabetes is associated with periodontitis and will induce an immune systemic reaction that could trigger insulin-resistance



4 Bidirectional link between periodontitis and metabolic diseases

Metabolic diseases are pathologies that affect cellular metabolism, such as energy production or storage. A metabolic syndrome can also be defined when a patient has at least three of the following five conditions: abdominal obesity, hypertriglyceridemia, decreased HDL levels, high blood pressure and hyperglycemia. Metabolic syndromes may have a genetic origin or develop over time due to extrinsic factors such as diet or sedentarity; they concern approximately 1 on 4 adults all around the world, even 1 on 3 in the United States of America [32]. The metabolic syndromes could be associated with oral disorders with more advanced gum or periodontal

modifications as reported in the five last years (Table 1). Indeed, the state of general inflammation that may result from metabolic diseases contributes to maintaining an inflammation in the periodontium and vice versa, pro-inflammatory cytokines produced in presence of a periodontitis contribute to maintaining a state of inflammation throughout the organism [57, 59, 77, 78]. Complications of several metabolic disorders, for example diabetic microangiopathy, also contribute to delayed healing of periodontal tissues prone to periodontitis [79]. More than 45 epidemiological studies have already been published in the last five years, on PubMed highlighting the frequent occurrence of periodontitis in patients with one or more symptoms of the metabolic syndrome during last 5 years (Table 2). However, the high diversity of studies parameters

Fig. 3 Impact of oral dysbiosis associated with periodontitis in metabolic disorders and potential therapeutic treatments. The factors inducing oral dysbiosis could trigger periodontitis. The periodontitis is associated with local and systemic inflammation, which could target the metabolic diseases. We can propose different medical strategies to prevent the impact of periodontitis on systemic health

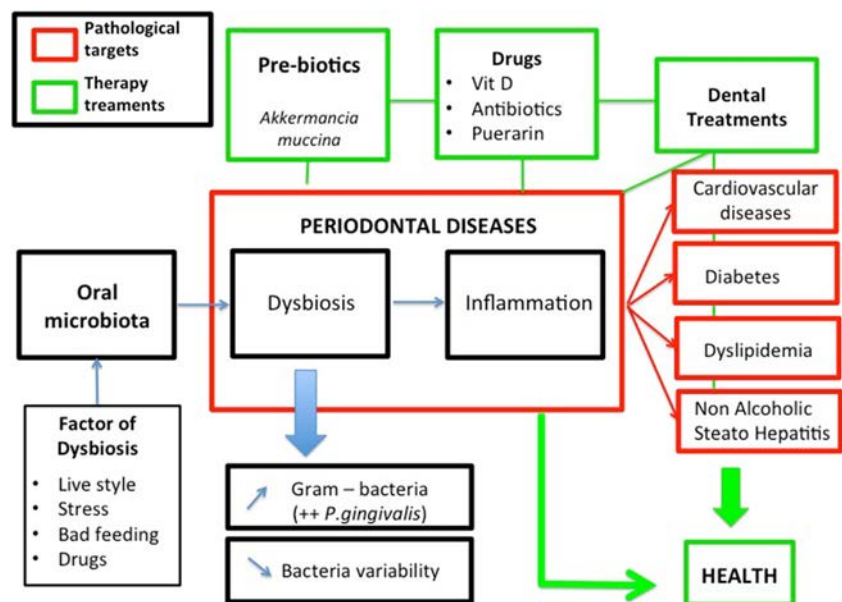


Table 1 Epidemiological studies available on Pubmed that have evaluate the relations between the manifestations of metabolic syndrome and periodontal diseases. PD is the abbreviation for “Periodontal Diseases” without distinction for a specific periodontal criteria; ABL is the abbreviation for “Alveolar Bone Loss”; GI for “Gingival Index”; MS for “Metabolic syndrome”; NAFLD for “Non

Alcoholic Fatty Liver Disease”; Not sig. For “Not Significant”. Only studies dealing with chronic metabolic diseases belonging to the family of 5 major metabolic disorders (...) were taken into account (as such, gestational diabetes have not been reported). Studies noted as “Data extraction” were performed by analyzing data from another study previously conducted

Year	First Author	Country	Type of study	Subjects	Studied parameters	n	Conclude to a link
2014	Amiri [33]	Iran	Cross-sectional	Adults	Diabetic retinopathy and PD	213	Yes
2014	LaMonte [34]	USA	Cross-sectional	Post-menopausal women	MS and PD	657	No
2014	Poplawska-Kita [35]	Poland	Cross-sectional	Adults	Diabetes and PD	147	Yes
2014	Pranckeviciene [36]	Lithuania	Cross-sectional	Adults	Types of diabetes and PD	266	Yes
2014	Sakalauskiene [37]	Lithuania	Cross-sectional	Adults	Diabetes and PD	56	Yes
2014	Schjetlein [38]	Denmark	Cross-sectional	Adults	Diabetes and PD	62	Prevalence only
2015	Ahmad [39]	Japan	Cross-sectional	Adults	Liver abnormalities, MS and PD in men	5477	Yes
2015	Alhabashneh [40]	Jordan	Cross-sectional	Adults	Diabetes, MS and PD	280	Yes
2015	Iwasaki [41]	Japan	Prospective	Elderly people	MS and PD	125	Yes
2015	Lee [42]	South Korea	Cross-sectional	Children	MS and PD	941	Yes
2016	Adachi [43]	Japan	Cross-sectional	Adults	Reflux esophagitis and PD	280	Yes for hypertension and dyslipidemia
2016	Chen [44]	China	Cross-sectional	Adults	MS and PD	303	Yes
2016	Corlan Puscu [45]	Romania	Cross-sectional	Adults	Diabetes, age and PD	75	Yes
2016	Furuta [46]	Japan	Retrospective	Adults	MS and tooth loss	2107	Yes
2016	Gomes-Filho [47]	Brazil	Cross-sectional	Adults	MS and PD	419	Yes
2016	Kaye [48]	USA	Prospective	Elderly men	MS and PD	760	Yes
2016	Morita [49]	Japan	Prospective	Adults	Cardiometabolic risk factors and PD	572	Yes
2016	Seraphim [50]	Brazil	Cross-sectional	Pregnant women	Stress, Diabetes and PD	96	Yes
2016	Tavakoli [51]	Iran	Cross-sectional	Hemodialysis adults	MS and PD	75	Yes
2017	Alazawi [52]	UK	cohort + data extracted	Adults	NAFLD and PD	69 + 817-2	Yes
2017	Deshpande [53]	India	Cross-sectional	Adults	Obesity and PD	100	Yes
2017	Drazewski [54]	Poland	Cross-sectional	Adults	Lysosomal Storage Diseases and gingivitis	36	Yes
2017	Goulart [55]	Brazil	Cross-sectional	Adults	Cardiovascular risk factors and PD	539	No
2017	Jaramillo [56]	Colombia	Cross-sectional	Adults	MS and PD	651	Yes
2017	Kikui [57]	Japan	Data extraction	Adults	MS and PD	1856	Yes
2017	Kitagawa [58]	Japan	Retrospective	Adults	MS risk factors and PD	36,110	Yes
2017	Musskopf [59]	Brazil	Cross-sectional	Adults	MS and PD	363	For tooth loss and attachment loss
2017	Nitta [27]	Japan	Cross-sectional	Adults	Diabetic microvascular complications and PD	620	Yes
2017	Popescu [60]	Romania	Cross-sectional	Adults	Diabetes and PD	10	Yes
2017	Sadeghi [61]	Iran	Cross-sectional	Adults	Diabetes and PD	100	Yes
2017	Sfasciotti [62]	Italy	Cross-sectional	Children	Obesity and gingival health	100	Yes
2017	Song [63]	South Korea	Data extraction	Adults	Diabetic retinopathy and PD	1138	Yes
2017	Vallogini [64]	Italy	Cross-sectional	Children	Obesity and PD	204	Inverse relation

Table 1 (continued)

Year	First Author	Country	Type of study	Subjects	Studied parameters	n	Conclude to a link
2018	Coelho [65]	Portugal	Cross-sectional	Children	Diabetes and PD	72	Yes
2018	Dhir [66]	India	Cross-sectional	Adults	Cardiovascular risk factors, diabetes and PD	350	Yes
2018	Diaz Rosas [67]	Mexico	Cross-sectional	Children	Diabetes and PD	60	Yes
2018	Kemer Dogan [68]	Turkey	Cross-sectional	Adults women	Hyperlipidemia, age and PD	67	Yes
2018	Kim [69]	South Korea	Cross-sectional	Adults	MS, sex and PD	5078	Yes
2018	Koo [70]	South Korea	Cross-sectional	Adults	MS and PD	13,196	Yes
2018	Nascimento [71]	Denmark	Data extraction	Adults	MS and PD	539	Yes
2018	Nibali [72]	UK	Cross-sectional	Adults	Left ventricular geometry, MS and PD	103	No
2018	Pham [73]	Vietnam	Cross-sectional	Adults	MS and PD	412	Yes
2019	Helenius-Hietala [74]	Finland	Data extraction	Adults	Liver disease and PD	6165	Yes
2019	Sakurai [75]	Japan	Prospective	Adults	MS and PD	390	Yes
2019	Zhao [76]	China	Retrospective	Adults	Metabolic comorbidities and PD	488	Yes

does not help to understanding the molecular and microbiological links that exist between these various pathologies. The prevalence of periodontitis within the diabetic population is around 60% while it ranges from 20% to 50% in the general population [80, 81]. Periodontitis could aggravate the incidence of diabetes because the patients with periodontal diseases have up to 27–53% chances to develop diabetes [82, 83]. It is necessary to realize dental check-up regularly in diabetic patients because the treatment of periodontal inflammation ameliorates the glycosylated haemoglobin by 0.4% [83]. The biological link between periodontitis and Type 2 Diabetes is misunderstood. In recent works, we have proposed the implication of intestinal and oral dysbiosis in the incidence of metabolic diseases [26, 84–86]. Diabetes is characterized by a partial or complete defect in the action of insulin, defined by insulin resistance. The origin of insulin resistance remains imperfectly characterized etiologically, but numerous studies in human and mice show an association with a chronic and permissive “low-grade” inflammatory reaction [11, 12, 87]. Inflammation is closely correlated to immune reaction: there is both an essential “physiological” level of inflammation, particularly controlling the microbiota, and important inflammatory reactions triggered in the presence of pathogenic species. The latter reaction is due in particular to the presence of inflammatory bacterial components, such as LPS present on the surface of Gram-negative bacteria. LPS could be released in local and systemic organs, leading to “metabolic endotoxemia” [88]. The oral diabetic dysbiosis is characterized by the specific bacterial species, *Porphyromonas*, which is highly expressed in periodontal diseases and may induce insulin resistance [26, 89]. *Porphyromonas* triggers an immune reaction in oral cavity led by macrophages. The

immune cells produce pro-inflammatory cytokines like TNF-alpha and IL-6 that increase the permeability of the epithelial barrier in the oral cavity [90]. The disruption of the barrier allowed the translocation of LPS and live bacteria, which can then cross the barrier, enter to the bloodstream, and cause an inflammatory phenomenon in metabolic target tissues [91, 92]. Moreover, the pro-inflammatory cytokines have a deleterious effect on the signaling pathways of insulin. Indeed, they inhibit insulin receptor signaling by activating phosphatases and serine threonine kinases that inactivate the insulin receptor substrates and thus block the corresponding signaling cascade. Indeed, inflammatory cytokines alter the action of insulin, which contributes to the maintenance of metabolic diseases and the development of insulin resistance.

A low-grade inflammation is also associated with cardiovascular diseases like atherosclerosis. A Swedish study has shown for the first time the translocation of oral bacteria into atherosclerotic plaques from carotid. Moreover, they describe the potential role of biomarkers from oral microbiota in the development of the vascular diseases [93]. By sequencing the oral microbiota, they identified a positive correlation between the abundance of *Fusobacterium*, Gram-negative oral bacteria, and the blood levels of total cholesterol and LDL in atherosclerotic patients. This evidence shows the translocation of oral bacterial into systemic circulation. Hence, different studies have indicated that treating periodontal disease and reducing Gram-negative oral bacteria [94–96] may improve metabolic control in diabetic patients.

Thus, several arguments in the literature suggest a strong relationship between metabolic diseases and periodontitis with an etiology: oral dysbiosis induces the immunoinflammatory reaction as a pathophysiological link.

5 Therapeutic treatment targeting oral microbiota in metabolic patients

Oral diseases are now viewed as a consequence of a deleterious shift in the balance of the normally stable resident oral microbiome. As previously shown, there is an epidemiologic link between periodontitis and diabetes, in fact the periodontitis treatment could reduce the HbA1c up to 0,4% in TD2 patients [97]. Many studies show the effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating TNF-alpha and HbA1c levels in patients with type 2 diabetes. So, both antibiotics and physical treatment for periodontitis have beneficial effect on type 2 diabetes. The neutralization or inhibition of disease drivers, together with the identification and promotion of health-promoting bacterial species and functions, for example, by pre- and probiotics, could enhance microbiome resilience and lead to new strategies to prevent disease [98] (as shown for the gut microbiota with the utilization of specific probiotics, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* and *Bifidobacterium catenulatum*, to treat liver injury by attenuating D-galactosamine). This way could be explored for oral microbiota management [99]. Growing evidence indicates that the oral microbiota plays a significant role in the pathophysiological processes of obesity and its related metabolic symptoms in the host. For example, Puerarin, an active ingredient in the root of *Pueraria lobate*, has been suggested to have a potent anti-obesity effect. Puerarin treatment greatly increased the abundance of *Akkermansia muciniphila* and increased intestinal expression levels of Muc2 and Reg3g, thus protecting intestinal barrier function (normal permeability) by increasing the expression of ZO-1 and occludin in vivo and in vitro [100]. Studies show that the proportion of *Akkermansia muciniphila* was inversely correlated with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice [101]. Treating the dysbiosis of the oral microbiota with *Akkermansia muciniphila* could enhance the epithelial barrier and prevent the translocation of oral bacteria and its metafactors. In mice, the treatment with the probiotic «*Bifidobacterium pseudocatenulatum* reduces obesity and inflammation through the improvement of mouth barrier [102].

Another link between periodontitis and metabolic disorder is the systemic level of Vitamin D. The relationship between vitamin D deficiency and insulin resistance could be linked through inflammation, as vitamin D deficiency is associated with increased inflammatory markers. Vitamin D deficiency contributes to both the initial insulin resistance and the subsequent onset of diabetes caused by β -cell death. Vitamin D acts to reduce inflammation, which is a major process in inducing insulin resistance. Vitamin D maintains the normal resting levels of both Ca²⁺ and ROS that are elevated in the β -cells during diabetes [103]. In addition, genetic polymorphisms of vitamin D -related genes may predispose to impaired

glycaemic control and type 2 diabetes. Epidemiologic studies have shown an association between low serum 25-hydroxyvitamin D3 (25(OH)D3) concentrations and an increased risk for the metabolic syndrome and type 2 diabetes. This may be partly explained by an increased fat mass. A low level of Vitamin D is associated with chronic periodontitis and more precisely low serum 1,25(OH)₂ D level, which is in line with the previously reported associations between serum 1,25(OH)₂ D levels and other inflammatory diseases [103]. Modulation of apoptosis is emerging as a promising anti-obesity strategy because removal of adipocytes through this process will result in reducing body fat. Nevertheless, high vitamin D and calcium intakes activate the Ca (2+) - mediated apoptotic pathway in adipose tissue. Thus, targeting this pathway with vitamin D and Ca (2+) supplementation could contribute to the prevention and treatment of both obesity and periodontitis [104–106]. In this way, the oral administration of cationic resin contributes to ameliorate the level of Vitamin D, reduces the endotoxemia, promotes the eubiosis of microbiota and prevents the fibrosis in hepatic steatosis. The authors have proposed this treatment for NASH to prevent the linked dysbiosis [107]. The deficiency in vitamin D aggravates the insulin-resistance associated with a dysbiosis in NAFLD patient. The supplementation in vitamin D restores alpha-defensin, epithelial barrier of intestinal integrity and maintains eubiosis in microbiota [107].

Thus, a number of promising therapeutic strategies, involving prebiotics, probiotics, vitamins and other agents are now available in the fight against periodontal diseases.

6 Conclusions

Oral microbiota is clearly a new important risk factor of metabolic diseases. Thus it is of great interest to better understand the role of this new partner rich of more than 10¹¹ CFU bacteria in our mouth. The oral microbiota could contribute to the worsening of metabolic parameters of patients and new therapeutic approaches to treat and prevent metabolic diseases targeting the oral microbiota could be an innovative medical strategy. By understanding the cross talk between oral microbiota and our organism, we could propose therapeutic based on prebiotics, probiotics, drugs targeted microbes. In the view of preventive and personalized medicine, the identification of new bacterial biomarkers from oral cavity will be necessary to prevent the development of metabolic disorders in patients at risk.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Compliance with ethical standards Not applicable for this review.

References

1. Pischon T, Hu F, Rexrode K, Girman C, Manson J, Rimm E. Inflammation, the metabolic syndrome, and risk of coronary heart disease in women and men. *Atherosclerosis*. 2008;197:392–9.
2. Firatli E. The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. *J Periodontol*. 1997;68:136–40.
3. D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Hingorani A, Deanfield J. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:3989–94.
4. Vergnes JN, Kaminski M, Lelong N, Musset AM, Sixou M, Nabet C. Maternal dental caries and pre-term birth: results from the EPIPAP study. *Acta Odontol Scand*. 2011.
5. Loe H. Care. D. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993;16:329–34.
6. Soell M, Hassan M, Miliuskaite A, Haikel Y, Selimovic D. The oral cavity of elderly patients in diabetes. *Diabetes Metab*. 2007;33(Suppl 1):S10–8.
7. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol*. 1986;1:48–57.
8. Doan N, Contreras A, Flynn J, Morrison J, Slots J. Proficiencies of three anaerobic culture systems for recovering periodontal pathogenic bacteria. *J Clin Microbiol*. 1999;37:171–4.
9. Saito T, Shimazaki Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontol*. 2007;43:254–66.
10. Hettne K, Weeber M, Laine M, Ten Cate H, Boyer S, Kors J. Automatic mining of the literature to generate new hypotheses for the possible link between periodontitis and atherosclerosis: lipopolysaccharide as a case study. *J Clin Periodontol*. 2007;34:1016–24.
11. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860–7.
12. Shoelson S, Lee J, Goldfine A. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793–801.
13. Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis: oral complication of diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2013;42(4):849–67. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.05.012>.
14. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol*. 2006;40:11–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x>.
15. Preshaw PM. Antibiotics in the treatment of periodontitis. *Dent Update*. 2004;31(8):448–50, 53–4, 56.
16. Taylor JJ, Preshaw PM. Gingival crevicular fluid and saliva. *Periodontol*. 2016;70(1):7–10. doi:<https://doi.org/10.1111/prd.12118>.
17. Foster BL. On the discovery of cementum. *J Periodontol Res*. 2017;52(4):666–85. <https://doi.org/10.1111/jre.12444>.
18. de Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: lessons for periodontal regeneration. *J Periodontol Res*. 2017;52(6):965–74. <https://doi.org/10.1111/jre.12477>.
19. Preshaw PM, Foster N, Taylor JJ. Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. *Periodontol*. 2007;45:138–157. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2007.00221.x>.
20. Tsuboi K, Hasegawa T, Hongo H, Yurimoto H, Kobayashi S. [Bone Cell Biology Assessed by Microscopic Approach. Novel insights about bone tissue by new microscopy systems]. *Clin Calcium*. 2015;25(10):1505–11. doi: [CliCa151015051511](https://doi.org/10.1155/2015/421746).
21. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
22. Listgarten MA, Loomer PM. Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8(1):182–92. <https://doi.org/10.1902/annals.2003.8.1.182>.
23. Field CA, Gidley MD, Preshaw PM, Jakubovics N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol Res*. 2012;47(4):470–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01455.x>.
24. Preshaw PM, Walls AW, Jakubovics NS, Moynihan PJ, Jepson NJ, Loewy Z. Association of removable partial denture use with oral and systemic health. *J Dent*. 2011;39(11):711–9. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.08.018>.
25. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(2):217–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03441.x>.
26. Blasco-Baque V, Garidou L, Pomie C, Escoula Q, Loubieres P, Le Gall-David S, et al. Periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut*. 2017;66(5):872–85. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309897>.
27. Fak F, Tremaroli V, Bergstrom G, Backhed F. Oral microbiota in patients with atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;243(2):573–8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.097>.
28. Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis*. 2017;23(3):276–86. <https://doi.org/10.1111/odi.12509>.
29. Al-Shehri SS, Sweeney EL, Cowley DM, Liley HG, Ranasinghe PD, Charles BG, et al. Deep sequencing of the 16S ribosomal RNA of the neonatal oral microbiome: a comparison of breast-fed and formula-fed infants. *Sci Rep*. 2016;6:38309. <https://doi.org/10.1038/srep38309>.
30. Feres M, Teles F, Teles R, Figueiredo LC, Faveri M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontol*. 2016;72(1):30–53. doi:<https://doi.org/10.1111/prd.12136>.
31. O'Dowd LK, Durham J, McCracken GI, Preshaw PM. Patients' experiences of the impact of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2010;37(4):334–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01545.x>.
32. Aguilar M, Bhuket T, Torres S, Liu B, Wong RJ. Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003–2012. *JAMA*. 2015;313(19):1973–4. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.4260>.
33. Amiri AA, Maboudi A, Bahar A, Farokhfard A, Daneshvar F, Khoshgoeian HR, et al. Relationship between type 2 diabetic retinopathy and periodontal disease in Iranian adults. *N Am J Med Sci*. 2014;6(3):139–44. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.128476>.
34. LaMonte MJ, Williams AM, Genco RJ, Andrews CA, Hovey KM, Millen AE, et al. Association between metabolic syndrome and periodontal disease measures in postmenopausal women: the Buffalo OsteoPerio study. *J Periodontol*. 2014;85(11):1489–501. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140185>.
35. Poplawska-Kita A, Siewko K, Szpak P, Krol B, Telejko B, Klimiuk PA, et al. Association between type 1 diabetes and periodontal health. *Adv Med Sci*. 2014;59(1):126–31. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2014.01.002>.
36. Pranckeviciene A, Siudikiene J, Ostrauskas R, Machiulskiene V. Severity of periodontal disease in adult patients with diabetes mellitus in relation to the type of diabetes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2014;158(1):117–23. <https://doi.org/10.5507/bp.2013.098>.
37. Sakalauskiene J, Kubilius R, Gleiznys A, Vitkauskiene A, Ivanauskiene E, Saferis V. Relationship of clinical and microbiological variables in patients with type 1 diabetes mellitus and

- periodontitis. *Med Sci Monit*. 2014;20:1871–7. doi:<https://doi.org/10.12659/MSM.890879>.
38. Schjetlein AL, Jorgensen ME, Lauritzen T, Pedersen ML. Periodontal status among patients with diabetes in Nuuk. *Greenland Int J Circumpolar Health*. 2014;73:26093. <https://doi.org/10.3402/ijch.v73.26093>.
 39. Ahmad A, Furuta M, Shinagawa T, Takeuchi K, Takeshita T, Shimazaki Y, et al. Association of periodontal status with liver abnormalities and metabolic syndrome. *J Oral Sci*. 2015;57(4):335–43. <https://doi.org/10.2334/josnusd.57.335>.
 40. Alhabashneh R, Khader Y, Herra Z, Asa'ad F, Assad F. The association between periodontal disease and metabolic syndrome among outpatients with diabetes in Jordan. *J Diabetes Metab Disord*. 2015;14:67. <https://doi.org/10.1186/s40200-015-0192-8>.
 41. Iwasaki M, Sato M, Minagawa K, Manz MC, Yoshihara A, Miyazaki H. Longitudinal relationship between metabolic syndrome and periodontal disease among Japanese adults aged ≥ 70 years: the Niigata study. *J Periodontol*. 2015;86(4):491–8. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140398>.
 42. Lee KS, Lee SG, Kim EK, Jin HJ, Im SU, Lee HK, et al. Metabolic syndrome parameters in adolescents may be determinants for the future periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2015;42(2):105–12. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12338>.
 43. Adachi K, Mishirot T, Tanaka S, Yoshikawa H, Kinoshita Y. A study on the relationship between reflux esophagitis and periodontitis. *Intern Med*. 2016;55(18):2523–8. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.6898>.
 44. Chen X, Xie L, Liu Y, Chen D, Yu Q, Gan X, et al. Metabolic syndrome and periodontal disease among civilian pilots. *Aerosp Med Hum Perform*. 2016;87(12):1016–20. <https://doi.org/10.3357/AMHP.4654.2016>.
 45. Corlan Puscus D, Ciuluvica RC, Anghel A, Malaescu GD, Ciursas AN, Popa GV, et al. Periodontal disease in diabetic patients - clinical and histopathological aspects. *Romanian J Morphol Embryol*. 2016;57(4):1323–9.
 46. Furuta M, Liu A, Shinagawa T, Takeuchi K, Takeshita T, Shimazaki Y, et al. Tooth loss and metabolic syndrome in middle-aged Japanese adults. *J Clin Periodontol*. 2016;43(6):482–91. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12523>.
 47. Gomes-Filho IS, das Mercedes MC, de Santana Passos-Soares J, Seixas da Cruz S, Teixeira Ladeia AM, Trindade SC et al. severity of periodontitis and metabolic syndrome: is there an association? *J Periodontol*. 2016;87(4):357–66. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150367>.
 48. Kaye EK, Chen N, Cabral HJ, Vokonas P, Garcia RI. Metabolic syndrome and periodontal disease progression in men. *J Dent Res*. 2016;95(7):822–8. <https://doi.org/10.1177/0022034516641053>.
 49. Morita T, Yamazaki Y, Fujiharu C, Ishii T, Seto M, Nishinoue N, et al. Association between the duration of periodontitis and increased Cardiometabolic risk factors: a 9-year cohort study. *Metab Syndr Relat Disord*. 2016;14(10):475–82. <https://doi.org/10.1089/met.2016.0018>.
 50. Seraphim AP, Chiba FY, Pereira RF, Mattered MS, Moimaz SA, Sumida DH. Relationship among periodontal disease, insulin resistance, salivary cortisol, and stress levels during pregnancy. *Braz Dent J*. 2016;27(2):123–7. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600596>.
 51. Tavakoli M, Izadi M, Yaghini J, Rastegari A, Abed AM. A survey on the effects of metabolic syndrome on the periodontal indices of hemodialysis patients. *Dent Res J (Isfahan)*. 2016;13(4):333–7.
 52. Alazawi W, Bernabe E, Tai D, Janicki T, Kemos P, Samsuddin S, et al. Periodontitis is associated with significant hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2017;12(12):e0185902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185902>.
 53. Deshpande NC, Amrutiya MR. Obesity and oral health - is there a link? An observational study. *J Indian Soc Periodontol*. 2017;21(3):229–33. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_305_16.
 54. Drazewski D, Grzymislawski M, Korybalska K, Czepulis N, Grzymislawski M, Witowski J et al. Oral Health Status of Patients with Lysosomal Storage Diseases in Poland. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(3). doi:<https://doi.org/10.3390/ijerph14030281>.
 55. Goulart AC, Armani F, Arap AM, Nejm T, Andrade JB, Bufarah HB, et al. Relationship between periodontal disease and cardiovascular risk factors among young and middle-aged Brazilians. Cross-sectional study Sao Paulo Med J. 2017;135(3):226–33. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2016.0357300117>.
 56. Jaramillo A, Contreras A, Lafaurie GI, Duque A, Ardila CM, Duarte S, et al. Association of metabolic syndrome and chronic periodontitis in Colombians. *Clin Oral Investig*. 2017;21(5):1537–44. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1942-9>.
 57. Kikui M, Kokubo Y, Ono T, Kida M, Kosaka T, Yamamoto M, et al. Relationship between metabolic syndrome components and periodontal disease in a Japanese general population: the Suita study. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24(5):495–507. <https://doi.org/10.5551/jat.33761>.
 58. Kitagawa M, Kurahashi T, Matsukubo T. Relationship between general health, lifestyle, Oral health, and periodontal disease in adults: a large cross-sectional study in Japan. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2017;58(1):1–8. <https://doi.org/10.2209/tdcpublication.2016-2100>.
 59. Musskopf ML, Daut LD, Weidlich P, Gerchman F, Gross JL, Oppermann RV. Metabolic syndrome as a risk indicator for periodontal disease and tooth loss. *Clin Oral Investig*. 2017;21(2):675–83. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1935-8>.
 60. Popescu D, Gheorghe D, Puiu I, Rica AM. Odontal-Periodontal Changes in Patients with Type 1 Diabetes. *Curr Health Sci J*. 2017;43(4):330–4. doi:<https://doi.org/10.12865/CHSJ.43.04.07>.
 61. Sadeghi R, Taleghani F, Mohammadi S, Zohri Z. The effect of diabetes mellitus type I on periodontal and dental status. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(7):ZC14–ZC7. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25742.10153>.
 62. Sfasciotti GL, Marini R, Pacifici A, Ierardo G, Pacifici L, Polimeni A. Childhood overweight-obesity and periodontal diseases: is there a real correlation? *Ann Stomatol (Roma)*. 2016;7(3):65–72. doi:<https://doi.org/10.11138/ads/2016.7.3.065>.
 63. Song SJ, Lee SS, Han K, Park JB. Periodontitis is associated with diabetic retinopathy in non-obese adults. *Endocrine*. 2017;56(1):82–9. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1215-z>.
 64. Vallogini G, Nobili V, Rongo R, De Rosa S, Magliarditi F, D'Anto V et al. Evaluation of the relationship between obesity, dental caries and periodontal disease in adolescents. *Eur J Paediatr Dent*. 2017;18(4):268–72. doi:<https://doi.org/10.23804/ejpd.2017.18.04.02>.
 65. Coelho A, Carneiro AS, Pereira VF, Paula AP, Macedo AP, Carrilho EVP. Oral Health of Portuguese Children with Type 1 Diabetes: A Multiparametric Evaluation. *J Clin Pediatr Dent*. 2018;42(3):231–5. doi:<https://doi.org/10.17796/1053-4628-42.3.12>.
 66. Dhir S, Kumar V. Are cardiovascular risk parameters and glycaemic levels associated with periodontitis in type 2 diabetes patients? A clinical study. *Indian Heart J*. 2018;70(3):430–2. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2017.10.002>.
 67. Diaz Rosas CY, Cardenas Vargas E, Castaneda-Delgado JE, Aguilera-Galaviz LA, Aceves Medina MC. Dental, periodontal and salivary conditions in diabetic children associated with metabolic control variables and nutritional plan adherence. *Eur J Paediatr Dent*. 2018;19(2):119–26. doi:<https://doi.org/10.23804/ejpd.2018.19.02.05>.

68. Kemer Dogan ES, Kirzioglu FY, Dogan B, Fentoglu O, Kale B. The effect of menopause on the relationship between hyperlipidemia and periodontal disease via salivary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and myeloperoxidase levels. *Acta Odontol Scand*. 2018;76(2):92–7. <https://doi.org/10.1080/00016357.2017.1386798>.
69. Kim OS, Shin MH, Kweon SS, Lee YH, Kim OJ, Kim YJ, et al. The severity of periodontitis and metabolic syndrome in Korean population: the dong-gu study. *J Periodontol Res*. 2018;53(3):362–8. <https://doi.org/10.1111/jre.12521>.
70. Koo HS, Hong SM. Prevalence and risk factors for periodontitis among patients with metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*. 2018;16(7):375–81. <https://doi.org/10.1089/met.2018.0003>.
71. Nascimento GG, Leite FRM, Peres KG, Demarco FF, Correa MB, Peres MA. Metabolic syndrome and periodontitis: a structural equation modeling approach. *J Periodontol*. 2019;90(6):655–62. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0483>.
72. Nibali L, Donos N, Terranova V, Di Pino A, Di Marca S, Ferrara V, et al. Left ventricular geometry and periodontitis in patients with the metabolic syndrome. *Clin Oral Investig*. 2019;23(6):2695–703. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2667-8>.
73. Pham T. The association between periodontal disease severity and metabolic syndrome in Vietnamese patients. *Int J Dent Hyg*. 2018;16(4):484–91. <https://doi.org/10.1111/idh.12350>.
74. Helenius-Hietala J, Suominen AL, Ruokonen H, Knuutila M, Puukka P, Jula A, et al. Periodontitis is associated with incident chronic liver disease—a population-based cohort study. *Liver Int*. 2019;39(3):583–91. <https://doi.org/10.1111/liv.13985>.
75. Sakurai SI, Yamada SI, Karasawa I, Sakurai A, Kurita H. A longitudinal study on the relationship between dental health and metabolic syndrome in Japan. *J Periodontol*. 2019;90(7):728–46. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0523>.
76. Zhao D, Zhen Z, Pelekos G, Yiu KH, Jin L. Periodontal disease increases the risk for onset of systemic comorbidities in dental hospital attendees: an 18-year retrospective cohort study. *J Periodontol*. 2019;90(3):225–33. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0224>.
77. Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, et al. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:16. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-16>.
78. Lamster IB, Pagan M. Periodontal disease and the metabolic syndrome. *Int Dent J*. 2017;67(2):67–77. <https://doi.org/10.1111/idj.12264>.
79. Nitta H, Katagiri S, Nagasawa T, Izumi Y, Ishikawa I, Izumiya H, et al. The number of microvascular complications is associated with an increased risk for severity of periodontitis in type 2 diabetes patients: results of a multicenter hospital-based cross-sectional study. *J Diabetes Investig*. 2017;8(5):677–86. <https://doi.org/10.1111/jdi.12633>.
80. Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology* 2000. 2002;29:7–10.
81. D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Hingorani AD, Deanfield J, et al. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):3989–94. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2522>.
82. Vergnes JN. Treating periodontal disease may improve metabolic control in diabetics. Evidence-based dentistry. 2010;11(3):73–4. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6400734>.
83. Borrell LN, Kunzel C, Lamster I, Lalla E. Diabetes in the dental office: using NHANES III to estimate the probability of undiagnosed disease. *J Periodontol Res*. 2007;42(6):559–65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.00983.x>.
84. Burcelin R, Serino M, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J. Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol*. 2011;48(4):257–73. <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0333-6>.
85. Blasco-Baque V, Kemoun P, Loubieres P, Amal JF, Gourdy P, Serino M, et al. Impact of type 2 diabetes on the development of periodontal disease in the mouse. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*. 2011;50(2):11–2.
86. Nicolas S, Blasco-Baque V, Fournel A, Gilleron J, Klopp P, Waget A, et al. Transfer of dysbiotic gut microbiota has beneficial effects on host liver metabolism. *Mol Syst Biol*. 2017;13(3):921. doi: <https://doi.org/10.15252/msb.20167356>.
87. Veitenhansl M, Stegner K, Hierl FX, Dieterle C, Feldmeier H, Gutt B, et al. 40th EASD annual meeting of the European Association for the Study of diabetes : Munich, Germany, 5-9 September 2004. *Diabetologia*. 2004;47(Suppl 1):A1–A464. <https://doi.org/10.1007/BF03375463>.
88. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(5):1219–23.
89. Courbon G, Rinaudo-Gaujous M, Blasco-Baque V, Auger I, Caire R, Mijola L, et al. *Porphyromonas gingivalis* experimentally induces periodontitis and an anti-CCP2-associated arthritis in the rat. *Ann Rheum Dis*. 2019. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213697>.
90. Amano A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci*. 2007;12:3965–74.
91. Burcelin R, Garidou L, Pomie C. Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic diseases. *Semin Immunol*. 2012;24(1):67–74. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.11.011>.
92. Burcelin R. Gut microbiota and immune crosstalk in metabolic disease. *Mol Metab*. 2016;5(9):771–81. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.05.016>.
93. Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, Tremaroli V, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(Suppl 1):4592–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011383107>.
94. Darré L, Vergnes J-N, Gourdy P, Sixou M. Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: a meta-analysis of interventional studies. *Diabetes Metab*. 2008;34:497–506.
95. Grossi S. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol*. 2001;6:138–45.
96. Miller L, Manwell M, Newbold D, Reding M, Rasheed A, Blodgett J. The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. *J Periodontol*. 1992;63:843–8.
97. Vergnes JN, Canceill T, Vinel A, Laurencin-Dalieux S, Maupas-Schwalb F, Blasco-Baque V, et al. The effects of periodontal treatment on diabetic patients: the DIAPERIO randomized controlled trial. *J Clin Periodontol*. 2018. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13003>.
98. Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the Oral microbiota in health: mechanisms that prevent Dysbiosis. *J Dent Res*. 2018;97(4):371–80. <https://doi.org/10.1177/0022034517742139>.
99. Fang D, Shi D, Lv L, Gu S, Wu W, Chen Y, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* LI09 and *Bifidobacterium catenulatum* LI10 attenuate D-galactosamine-induced liver injury by modifying the gut microbiota. *Sci Rep*. 2017;7(1):8770. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09395-8>.
100. Wang L, Wu Y, Zhuang L, Chen X, Min H, Song S, et al. Puerarin prevents high-fat diet-induced obesity by enriching *Akkermansia muciniphila* in the gut microbiota of mice. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218490>.

101. Schneeberger M, Everard A, Gomez-Valades AG, Matamoros S, Ramirez S, Delzenne NM, et al. Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Sci Rep*. 2015;5:16643. <https://doi.org/10.1038/srep16643>.
102. Moya-Perez A, Neef A, Sanz Y. Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 reduces obesity-associated inflammation by restoring the lymphocyte-macrophage balance and gut microbiota structure in high-fat diet-fed mice. *PLoS One*. 2015;10(7):e0126976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126976>.
103. Berridge MJ. Vitamin D deficiency and diabetes. *Biochem J* 2017;474(8):1321–1332. doi:<https://doi.org/10.1042/BCJ20170042>.
104. Cai T, Yang ZY, Nie L, Zhen JX, Deng L, Zhou Z. Association between vitamin D receptor BsmI gene polymorphism and periodontitis: a meta-analysis in a single ethnic group. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2017;63(11):1–4. doi:<https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.11.1>.
105. Ratheesh V, Subramanian S, Prakash PSG, Victor DJ. Evaluation of Association of Vitamin D Receptor Genetic Polymorphism with severe chronic periodontitis in an ethnic Tamilian population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018;22(10):615–21. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2018.0190>.
106. Murthykumar K, Arjunker R, Jayaseelan VP. Association of vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and chronic periodontitis. *J Investig Clin Dent*. 2019:e12440. doi:<https://doi.org/10.1111/jicd.12440>.
107. Zhu A, Chen J, Wu P, Luo M, Zeng Y, Liu Y, et al. Cationic polystyrene resolves nonalcoholic Steatohepatitis, obesity, and metabolic disorders by promoting Eubiosis of gut microbiota and decreasing Endotoxemia. *Diabetes*. 2017;66(8):2137–43. <https://doi.org/10.2337/db17-0070>.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

RESUME EN FRANÇAIS

La cavité buccale, deuxième microbiote après l'intestin, héberge plus de 800 espèces bactériennes. Les dysbioses intestinales entraînent des conséquences locales et systémiques participant au développement de pathologies. Notre but était d'étudier les relations entre la santé bucco-dentaire et son microbiote et d'évaluer leurs implications sur l'état de santé.

Nous avons mené deux études cliniques pilotes. La première chez des athlètes de haut niveau conclut à une augmentation des pathologies carieuses et parodontales associée à une augmentation de bactéries (streptocoques). La seconde suggère que les paramètres biologiques et du microbiote salivaires pourraient être les signatures du sexe et du statut nutritionnel permettant un diagnostic rapide et non invasif de pathologies métaboliques.

Enfin, la colonisation de la cavité endodontique de souris par un pathogène buccal, *Porphyromonas gingivalis*, montre que son lipopolysaccharide et sa régulation de l'Interleukine17 altèrent la tolérance au glucose et aggravent le diabète.

Ces résultats ouvrent une perspective pour promouvoir la diversité du microbiote oral en tant que nouvelle stratégie thérapeutique.

SHORT ENGLISH SUMMARY

The oral cavity, the second microbiota after the intestine, is home to more than 800 bacterial species. Intestinal dysbiosis leads to local and systemic consequences participating in the development of pathologies. Our goal was to study the relationships between oral health and the oral microbiota and to assess their implications for health status.

We conducted two pilot clinical studies. The first in high-level athletes shows an increase in caries and periodontal pathologies associated with an increase in bacteria (*streptococcus*). The second suggests that biological parameters and the salivary microbiota could be the signatures of gender and nutritional status, allowing rapid and non-invasive diagnosis of metabolic pathologies.

Finally, the colonization of the endodontic cavity of mice by an oral pathogen, *Porphyromonas gingivalis*, shows that its lipopolysaccharide and its regulation of Interleukin17 alter glucose tolerance and worsen diabetes.

These results open perspectives of promoting the diversity of the oral microbiota as a new therapeutic strategy.