

Microbiote oral, l'intersection de la santé orale et générale : Aperçu de : 1. Infection du ligament parodontal par HSV-1 2. Détection quantitative simultanée à haut débit du microbiote oral 3. Impact du sport d'endurance sur le microbiote oral

Morgane Ortis

▶ **To cite this version:**

Morgane Ortis. Microbiote oral, l'intersection de la santé orale et générale : Aperçu de : 1. Infection du ligament parodontal par HSV-1 2. Détection quantitative simultanée à haut débit du microbiote oral 3. Impact du sport d'endurance sur le microbiote oral. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2024. Français. ⟨NNT : 2024COAZ6031⟩. ⟨tel-04973815⟩

HAL Id: tel-04973815

https://theses.hal.science/tel-04973815v1

Submitted on 3 Mar 2025

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

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



HAL Authorization

UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR | ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THÈSE DE DOCTORAT

Microbiote oral : l'intersection de la santé orale et générale

Aperçu de :

1. Infection du ligament parodontal par HSV-1
2. Détection quantitative simultanée à haut débit du microbiote oral
3. Impact du sport d'endurance sur le microbiote oral

Morgane ORTIS

Laboratoire MICORALIS, UPR 7354

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Immunologie et Microbiologie

d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. Alain Doglio

Soutenue le : 28 novembre 2024

Devant le jury, composé de :

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

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

Sonia Burrel, PU-PH, Université de Bordeaux

Vincent Meuric, PU-PH, Université de Rennes 1

UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR

FRANCE 2030 Initiative d'Excellence

Microbiote oral : l'intersection de la santé orale et générale

Aperçu de :

1. Infection du ligament parodontal par HSV-1
2. Détection quantitative simultanée à haut débit du microbiote oral
3. Impact du sport d'endurance sur le microbiote oral

Jury

Président du Jury

Laurence Lupi, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier (PU-PH), Université de Côte d'Azur, Laboratoire Microbiologie Orale, Immunothérapie et Santé (MICORALIS) et CHU de Nice

Directeur de thèse

Alain Doglio, Maitre de conférences et Praticien Hospitalier (MCU-PH), Université Côte d'Azur, Laboratoire Microbiologie Orale, Immunothérapie et Santé (MICORALIS)

Rapporteurs

Sonia Burrel, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier (PU-PH), Université de Bordeaux, CNRS UMR 4232 – Fundamental Microbiology and Pathogenicity, CHU de Bordeaux

Vincent Meuric, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier (PU-PH), Université de Rennes 1, INSERM U1241 NuMeCan et CHU de Rennes

Résumé

Le microbiote oral, qui se compose d'une diversité remarquable de micro-organismes, est désormais reconnu comme un acteur clé de la santé bucco-dentaire et de la santé globale. Cette thèse explore ses dynamiques à travers trois axes principaux : (1) une découverte essentielle révélant que le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) peut infecter le ligament parodontal, (2) le développement d'une technologie pour détecter et quantifier le microbiote oral, et (3) l'étude ORASPORT, qui examine le lien entre l'activité physique et le microbiote oral.

La première section de cette thèse présente une avancée dans la compréhension des interactions entre les virus et les tissus parodontaux. HSV-1 est traditionnellement connu pour sa latence dans les ganglions nerveux sensitifs et ses manifestations lésionnelles dans la cavité orale. Cependant, cette étude est la première à démontrer que HSV-1 est capable d'infecter le ligament parodontal (PDL), un tissu conjonctif essentiel à la stabilité dentaire. Grâce à des expériences d'infection *ex vivo* sur des cellules et des fragments de PDL, nous avons montré que le virus peut induire une réponse inflammatoire et affecter la structure du PDL. Ce travail suggère que le PDL pourrait être un site potentiel d'infection virale, contribuant à la progression des maladies parodontales. En synergie avec des bactéries pathogènes orales, HSV-1 pourrait exacerber les réponses inflammatoires et la destruction tissulaire caractéristique de la parodontite.

Le deuxième axe de cette thèse concerne le développement d'une technologie microfluidique haut débit pour analyser le microbiote oral. Nous avons élaboré une plaque spécifique du microbiote oral, utilisant le système Biomark™ HD, capable de détecter et de réaliser la quantification absolue de 38 espèces bactériennes et des 8 *Herpesvirus* humains. Cet outil fournira une compréhension approfondie des interactions microbiennes, de leur rôle dans la santé bucco-dentaire et des processus inflammatoires ou infectieux associés. Ce système innovant représente un avancement significatif dans l'étude de la dysbiose du microbiote oral et ouvre la voie à des recherches supplémentaires sur ses implications dans diverses pathologies.

La dernière section de cette thèse présente l'étude ORASPORT, qui examine l'impact de l'activité physique sur le microbiote oral, un domaine encore peu exploré. Selon des études récentes, seulement 5 % des adultes français pratiquent une activité physique suffisante pour maintenir leur santé. L'étude ORASPORT a recruté 86 jeunes adultes (18-30 ans) répartis en trois groupes selon leur niveau d'activité physique (sédentaires, actifs, très actifs) afin de déterminer comment l'exercice d'endurance influence la composition microbienne orale. Les résultats préliminaires révèlent des variations significatives du microbiote oral en fonction du niveau d'activité, suggérant que l'exercice physique

pourrait aider à maintenir un équilibre microbien bénéfique pour la santé bucco-dentaire.

Cette thèse souligne l'importance du microbiote oral en tant qu'indicateur de la santé globale, met en évidence l'influence du mode de vie sur son équilibre, et révèle un nouveau rôle potentiel des infections virales dans les maladies parodontales.

Mots clés : Microbiote oral ; Herpès virus simplex de type 1 (HSV-1) ; Ligament parodontal (PDL) ; Système Biomark™ HD ; Activité physique

Abstract

The oral microbiota, consisting of a remarkable diversity of microorganisms, is now recognized as a key player in oral and overall health. This thesis explores its dynamics through three main axes: (1) a pivotal mechanistic finding revealing that herpes simplex virus type 1 (HSV-1) can infect the periodontal ligament, (2) the development of a technology for detecting and quantifying the oral microbiota, and (3) the ORASPORT study investigating the link between physical activity and the oral microbiota.

The first section of this thesis presents a breakthrough in understanding the interactions between viruses and periodontal tissues. HSV-1 is traditionally known for its latency in sensory nerve ganglia and its lesional manifestations in the oral region. However, this study is the first to demonstrate that HSV-1 can infect the periodontal ligament (PDL), a connective tissue essential for tooth stability. Through *ex vivo* infection experiments on PDL cells and fragments, we showed that the virus can induce an inflammatory response and affect the PDL structure. This work suggests that the PDL is a potential site of viral infection, contributing to the progression of periodontal diseases. In synergy with oral pathogenic bacteria, HSV-1 could exacerbate inflammatory responses and the tissue destruction characteristic of periodontitis.

The second focus of this thesis involved the development of a customized technology for analyzing the oral microbiota. We developed a specific array using the Biomark™ HD system, capable of detecting and performing absolute quantification of 38 oral bacterial species and the 8 human herpesviruses. This tool provides a deeper understanding of microbial interactions, their role in oral health, and the associated inflammatory or infectious processes. This innovative system represents a significant advancement in studying dysbiosis of oral microbiota and paves the way for further research on its implications in various pathologies.

The final section of this thesis, the ORASPORT study, examines the impact of physical activity on the oral microbiota, an underexplored area. According to recent studies, only about 5% of French adults engage in sufficient physical activity to maintain their health. ORASPORT recruited 86 young adults (18-30 years) divided into three groups based on their physical activity level (sedentary, active, very active) to determine how endurance exercise influences oral microbial composition. The preliminary results reveal significant variations in the oral microbiota depending on the activity level, suggesting that physical exercise may help maintain a beneficial microbial balance for oral health.

This thesis highlights the importance of oral microbiota as an indicator of overall health, emphasizes the influence of lifestyle on its balance, and reveals a new potential role of viral infections in

periodontal diseases.

Keys words : Oral microbiota; Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ; Periodontal ligament (PDL) ; BiomarkTM HD Système ; Physical activity

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de bien vouloir examiner mon travail. C'est un honneur de pouvoir partager avec vous mes premiers pas dans le monde de la recherche.

Merci à l'IPMC. Bernard, merci pour tous tes conseils, pour avoir toujours pris le temps de m'accompagner et pour ton accueil au sein de ton équipe. Julien, merci d'avoir passé des heures et des heures à me former, à m'aider à faire les manips, et pour tous nos moments passés pendant les pauses café au soleil.

Merci également au LAMHESS. Valérie, ta bonne humeur permanente et ton énergie communicative était toujours au rendez-vous. Merci pour ton aide dans le recrutement des sportifs et pour toutes nos participations aux évènements sportifs.

Un immense merci à l'ensemble du laboratoire MICORALIS, sans qui je n'en serais pas ici aujourd'hui.

Alain, je te suis infiniment reconnaissante de m'avoir choisi il y a plus de 3 ans et de toujours avoir cru en moi. Merci pour toute la confiance que tu m'accordes au quotidien qui me permet d'évoluer. Merci pour tout ce que tu as fait et continues de faire pour moi. J'ai adoré travailler sous ta direction et j'espère que tu considéreras cette thèse comme un joli cadeau de pré-retraite (et d'anniversaire) !

Je remercie tout le personnel de la Fac d'Odonto, tous les dentistes avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler, d'apprendre et de transmettre. Une pensée particulière à Laurence et Marie-France, qui ont toujours été d'un soutien sans faille. Encore une petite année et je pouvais presque me reconvertir en dentiste !

Quentin et Clara, mon petit duo, merci pour votre soutien, pour nos rires et nos debriefing le midi. J'ai pris énormément de plaisir à vous encadrer du mieux que je le pouvais.

Je tiens sincèrement à remercier Robert pour tout le temps qu'il a passé à m'enseigner le monde de la culture cellulaire qui m'était inconnu, pour tous tes conseils avisés et toutes les petites pauses cafés que nous avons partagé !

Merci à mes collègues et amies Lilit, Juliane et Margaux, merci de tout cœur. Sans vous, je n'aurais pas tenu. Merci pour tous ces moments qu'on passe ensemble, à manger, boire un verre, rire et faire du sport (oui, ça nous arrive aussi !). Lilit, merci du soutien que tu m'apportes au quotidien, de toujours

répondre à mes doutes avec patience, de toujours me dire que je peux y arriver. Sans toi, mon quotidien au labo aurait été bien vide. Juliane, merci d'être l'amie exceptionnelle que tu es. Tu m'as apporté une vraie bouffée d'air frais au moment où j'en avais le plus besoin et tu as toujours été d'un soutien infaillible. J'ai hâte de revenir vous voir au Danemark. Margaux, je n'aurais pas pu rêver d'un meilleur binôme que toi. Merci d'être là chaque jour, de me soutenir, de toujours trouver les mots justes, et d'être celle que tu es.

A mon ex belle-famille, pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de ces années.

A mes amis de Rennes, à Olive, à Thom, merci d'être encore là après 8 années passées ensemble. Merci pour toutes ces années à l'Université, merci à mes profs qui m'ont transmis la passion de la Microbio. Rennes, on se reverra surement bientôt.

A mes amis de Nice, merci de m'avoir fait me sentir chez moi ici. Merci de toujours écouter mes histoires folles, de toujours être présents et partants pour aller danser, faire un barbecue ou voir des couchers de soleil !

A mes amis de la boxe, je suis tellement heureuse que vous fassiez partie de ma vie, j'ai trouvé en vous ma deuxième famille.

A toi ma Leslouche, merci d'être celle que tu es. Sans toi, je ne pourrais être celle que je suis aujourd'hui. Merci de croire en moi, de me soutenir, et de me faire rire chaque jour. Ma vie sans toi ne serait pas la même.

Et comment ne pas profiter de cette occasion pour ne pas remercier toute ma famille, ma marraine, mon parrain, Théa, mes cousins et cousines, mon filleul, mes oncles et tantes… Ceux qui ne sont plus là, en particulier mon grand-père et arrière-grand-père, mes étoiles.

Maman, Papou, Pépé et Mémé, je vous dois tout. Merci pour tout ce que vous faites pour moi, de votre soutien inconditionnel chaque jour, malgré la distance. Vous êtes mes sources d'inspiration au quotidien. Je suis fière et reconnaissante de vous avoir. Jamais vous n'avez douté de moi, votre soutien vaut tout pour moi. C'est grâce à vous si je peux aujourd'hui écrire cette thèse. Je vous aime.

A toutes les personnes qui me soutiennent de près ou de loin,

Juste, merci.

Présentation du consortium des laboratoires impliqués

Le laboratoire **MICORALIS** (UPR 7354, Université Côte d'Azur (UniCA) – EUR Healthy), localisé au sein de la Faculté de Chirurgie dentaire de Nice, est spécialisé dans les études qui concernent l'étiopathogénie des maladies orales et les relations entre la microbiologie orale et la santé orale. L'expertise du laboratoire s'appuie sur une forte expérience et un plateau technique adapté.

La plateforme CRISPR SCREEN de l'**IPMC** à Sophia Antipolis (UMR UniCA / CNRS 7275) est spécialisée dans l'analyse moléculaire à haut débit des acides nucléiques. Le Dr Bernard MARI, chercheur CNRS et chef d'équipe à l'IPMC, a une expertise internationalement reconnue dans les technologies de pointe en génomique et nous a fourni un accès complet à la plateforme de génomique fonctionnelle de l'Institut.

Le **LAMHESS** (UPR 6312 UniCA – Healthy) est le laboratoire du Campus Sciences du sport de l'UniCA. Cette unité est spécialisée dans l'étude de la haute performance et l'activité physique pour la santé. Le Dr. Valérie Bougault est reconnue pour ses travaux sur la santé respiratoire des sportifs de haut niveau en relation avec leur environnement (Bougault et al. 2022).

L'**Institut de médecine bucco-dentaire** assure la prise en charge clinique et le soin des patients qui consultent au Pôle d'Odontologie du CHU de Nice.

Avant-propos

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de contribuer à plusieurs publications scientifiques, témoignant de l'avancée de mes travaux de recherche. En 2024, deux articles ont été publiés dans des revues internationales. Le premier, intitulé « Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Human Periodontal Ligament » (Ortis et al. 2024), a été publié dans l'*International Journal of Molecular Science,* que j'ai signé en tant que co-première auteure. Le second article, « Centrifugal Microfluidic Cell Culture Platform for Physiologically Relevant Virus Infection Studies: A Case Study with HSV-1 Infection of Periodontal Cells » (Christfort et al. 2024), publié dans le journal *Biosensors,* où je suis deuxième auteure. Ces publications font l'objet de la première partie de ma thèse, relative à l'étude des mécanismes cellulaires et virologiques décrivant le rôle des *Herpesvirus* dans l'étiopathogénie de la parodontite.

La deuxième partie de mon travail doctoral concerne l'étude du microbiote oral et fait l'objet de travaux encore en cours et non publiés à ce jour. J'ai cependant pu valoriser ces recherches au niveau national, avec deux publications en 2024. La première est une revue narrative intitulée « Microbiote oral et santé bucco-dentaire des sportifs : revue narrative » (Dubois, Ortis, et al. 2024), publiée dans le *Cahier de nutrition et de diététique* dont je suis co-première auteure. La seconde publication, parue dans le journal de l'*Information dentaire,* s'intitule « Santé orale et performances sportives : les spécificités de la prise en charge du patient-athlète » (Dubois, Deroche, et al. 2024), où je suis avant-dernière auteure.

Par ailleurs, mes travaux non encore publiés concernent le développement et la validation d'un outil de PCR microfluidique à haut débit, qui permet la détection et la quantification simultanée de 39 bactéries orales et des 8 *Herpesvirus* humain. La suite de ce travail met en lumière les applications possibles de cette technologie chez les patients présentant divers états de santé bucco-dentaire, ou selon la pratique sportive. Ces travaux nécessitent encore des ajustements et des validations, mais ils sont suffisamment avancés pour être présentés dans ce manuscrit et envisager leurs publications en 2025.

Tout au long de mon parcours doctoral, j'ai eu l'honneur de présenter mes travaux de recherche en communications orales lors du congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM) en 2023 à Rennes, ainsi qu'aux journées de l'école doctorale Ed85. J'ai également eu l'occasion de partager mes résultats avec le grand public lors de la Fête de la Science de Nice, contribuant ainsi à la diffusion de la science au-delà du cadre académique.

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

CMV : Cytomégalovirus

EBV : Epstein barr virus

HHV : *Herpesvirus* humain

HSV-1 : Herpes virus simplex 1

HSV-2 : Herpes virus simplex 2

IFC : Integrated fluidic circuit

IPMC : Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

LAMHESS : Laboratoire Motricité Humaine Expertise Sport Santé

MP : Maladies parodontales

NGS : Next Generation Sequencage

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDL : Ligament parodontal

VZV : Varicella Zona virus

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction générale : Les microbiotes, de l'eubiose à la dysbiose.....19

I. Les microbiotes.....20

1. Microbiote oral et lien avec le microbiote intestinal 22

2. Le microbiote oral.....23

a. Composition et facteurs influençant le microbiote oral.....23

b. Le biofilm.....27

c. Équilibre et déséquilibre du microbiote oral : eubiose et dysbiose 28

II. Les maladies orales : maladies parodontales et caries dentaires.....30

1. La parodontite 30

a. La parodontite, facteur de risque des pathologies systémiques : 33

2. La gingivite 35

3. La carie dentaire.....36

III. Étiopathogénie des maladies parodontales.....37

1. La théorie de Socransky.....38

IV. Implication des *Herpesvirus* humain dans les pathologies orales 40

1. Présence des HHV dans la cavité orale.....44

2. Implication des HHV dans les maladies parodontales.....45

Chapitre 2 : Infection du ligament parodontal par HSV-1 ; Première mise en évidence 47

I. Introduction.....48

II. Première mise en évidence de l'infection des cellules du ligament parodontal par HSV-1

50

Chapitre 3 : Détection quantitative simultanée à haut débit du microbiote oral ; Révéler la complexité 64

I. Technologies pour l'étude des microbiotes : avancées et limites 65

II. Développement de l'outil de détection et de quantification du microbiote oral sur le Biomark™ HD 67

1. La PCR microfluidique à haut débit : le système Biomark™ HD 67

b. Utilisation de la technologie Biomark™ HD pour l'étude du microbiote oral 69

c. Définition du panel de bactéries et virus sélectionné pour l'étude 69

2. Matériels et méthodes de la mise en place de la technologie 71

a. Constitution d'une librairie d'ADN étalons 71

b. Efficacité des PCR mesurée par qPCR conventionnelle avec les gammes étalons 76

c. Validation sur la technologie du Biomark™ HD (en cours) 81

III. Validation de l'array de détection et de quantification du microbiote oral par PCR microfluidique sur des prélèvements biologiques 83

1. Matériels et méthodes de l'étude 83

a. Conception de l'étude et critères d'inclusion 83

b. Recrutement des donneurs 84

c. L'examen bucco-dentaire 84

d. Prélèvements bucco-dentaires et extraction d'ADN 85

e. Quantification des échantillons par qPCR conventionnelle et Biomark™ HD 85

f. Analyses statistiques 86

2. Résultats préliminaires de l'étude 87

a. Comparaison entre la qPCR conventionnelle et le Biomark™ HD.....87

b. Utilisation de la technologie Biomark™ HD pour analyser la présence des 48 espèces microbiennes orales dans la salive, en fonction de la santé bucco-dentaire 92

c. Utilisation de la technologie Biomark™ HD pour analyser la présence des 48 espèces microbiennes orales dans les frottis gingivaux, en fonction de la santé bucco-dentaire 96

d. Analyse comparative des résultats obtenus dans les salives et les écouvillons gingivaux 99

3. Conclusions.....101

Chapitre 4 : Impact du sport d'endurance sur l'écosystème oral ; Frontières du mode de vie103

I. Introduction.....104

II. Revue narrative : Microbiote oral et santé bucco-dentaire des sportifs.....104

III. Présentation du projet ORASPORT.....117

1. Participants et déroulé de la visite d'inclusion 118

2. Définition des groupes d'étude 119

3. Les prélèvements 119

IV. Traitements des échantillons.....120

V. Résultats & Discussion ORASPORT 121

1. Description des participants inclus dans l'étude (au 24/09/2024) 121

2. Analyse de la composition microbienne de la salive des participants 122

3. Analyse de la composition microbienne des écouvillons gingivaux des participants 128

4. Comparaison de deux types de prélèvements : salives et écouvillons gingivaux.....131

VI. Conclusion et perspectives 134

Les annexes.....146

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des principaux microbiotes du corps humain. 21

Figure 2 : Interactions et facteurs du microbiote oral influençant le microbiote intestinal. 23

Figure 3 : Cartographie du microbiote oral selon les différentes niches écologiques de la cavité orale. 25

Figure 4 : Les principaux facteurs impliqués dans la composition du microbiote oral. 26

Figure 5 : Formation et dynamique du biofilm oral.....28

Figure 6 : Dysbiose : Mécanismes et conséquences du déséquilibre microbien 29

Figure 7 : Synergie polymicrobienne et dysbiose dans la parodontite. 32

Figure 8 : Schéma d'une dent affectée par une carie dentaire. 37

Figure 9 : Schéma actualisé des complexes microbiens oraux selon la classification de Socransky. .40

Figure 10 : Structure détaillée des Herpesvirus : organisation et composants fonctionnels.....41

Figure 11 : Classification des Herpesvirus humains en sous-famille. 42

Figure 12 : Structure et organisation des tissus parodontaux. 49

Figure 13 : Présentation de la technologie Biomark™ HD de Standard Biotools et d'une puce microfluidique présentant le circuit de fluide intégré (IFC). 68

Figure 14 : Sélection des espèces microbiennes pour l'analyse du microbiote oral.....70

Figure 15 : Gamme étalon pour la quantification d'un gène spécifique (troA) de Prevotella denticola. 77

Figure 16 : Gamme étalon pour la quantification d'un gène spécifique (lmp1) de l'Epstein Barr virus (EBV).....78

Figure 17 : Courbes étalons illustratives pour la quantification des gènes spécifiques des huit HHV et de quatre bactéries.....81

Figure 18 : Reproductibilité et répétabilité de la détection du contrôle positif sur la technologie du Biomark™ HD.....83

Figure 19 : Comparaison des performances de détection du Biomark™ HD et de la qPCR conventionnelle pour les espèces bactériennes et virales dans des échantillons salivaires. 90

Figure 20 : Répartition des populations bactériennes et virales dans les échantillons salivaires selon l'état de santé bucco-dentaire. 92

Figure 21 : Analyse des variations du microbiote oral dans les échantillons de crachats salivaires selon les états de santé bucco-dentaire. 94

Figure 22 : Répartition des populations bactériennes et virales dans les écouvillons gingivaux selon l'état de santé bucco-dentaire. 96

Figure 23 : Analyse des variations du microbiote oral dans les écouvillons gingivaux selon les états de santé bucco-dentaire.....98

Figure 24 : Comparaison des abondances microbiennes dans les crachats salivaires et les écouvillons gingivaux.....101

Figure 25 : Représentation schématique des différentes étapes de l'étude pilote ORASPORT.....117

Figure 26 : Schéma illustratif de la procédure collecte des prélèvements salivaires.....120

Figure 27 : Répartition des participants de l'étude ORASPORT en fonction de leur niveau d'activité physique. 122

Figure 28 : Heatmap des abondances de 48 espèces microbiennes dans les prélèvements salivaires selon le niveau d'activité physique. 123

Figure 29 : Bactéries orales dont l'abondance salivaire diffère en fonction de la pratique d'activité physique d'endurance. 125

Figure 30 : Heatmap des quantifications moyennes de 48 espèces microbiennes dans les écouvillons gingivaux selon le niveau d'activité physique. 128

Figure 31 : Bactéries orales dont l'abondance diffère dans les écouvillons gingivaux en fonction de la pratique d'activité physique d'endurance. 130

Figure 32 : Comparaison de l'abondance des différentes espèces entre les prélèvements salivaires et les écouvillons gingivaux en fonction du niveau d'activité physique. 133

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des 8 Herpesvirus humain 43

Tableau 2 : Fréquence des infections à EBV, CMV et HSV-1 dans les différents stades de la parodontite. 46

Tableau 3 : Caractéristiques des espèces microbiennes ciblées et séquences des amorces utilisées pour leur détection et quantification.....73

Tableau 4 : Paramètres de performance des courbes étalons en qPCR conventionnelle pour la détection des espèces microbiennes. 79

Chapitre 1 : Introduction générale : Les microbiotes, de l'eubiose à la dysbiose

I. Les microbiotes

Au cours des deux dernières décennies, l'intérêt pour les microbiotes a considérablement augmenté, révélant leur rôle central dans le maintien de l'équilibre et du bon fonctionnement de l'organisme humain. L'avènement des technologies de séquençage à haut débit a particulièrement révolutionné notre compréhension de ces communautés microbiennes, permettant de mieux appréhender leur diversité et la complexité des interactions entre l'hôte et les milliards de micro-organismes qu'il héberge. Un microbiote est défini comme l'ensemble de micro-organismes (bactéries, virus, parasites champignons, archées…) coexistant dans un environnement spécifique. Cette symbiose est telle que l'ensemble de l'hôte et de ses microbiotes ne sont désormais considéré comme une unité indissociable, conduisant à la notion d'holobionte ou encore, de super-organisme. Dans cet écosystème équilibré, les micro-organismes contribuent au métabolisme et à la défense de l'organisme, tandis que l'hôte leur offre un habitat favorable. Chaque individu possède des microbiotes uniques, considérés comme une véritable « carte d'identité » microbiologique. Toutefois, la définition d'un microbiote optimal pour chaque individu et à chaque étape de la vie demeure aujourd'hui encore assez incertaine.

Chez l'homme, différents microbiotes colonisent diverses parties du corps, telles que la peau, les muqueuses orales, génitales, et surtout l'intestin, qui abrite le microbiote le plus abondant, représentant jusqu'à plusieurs kilogrammes de matière microbienne (Figure 1). L'étude des microbiotes humains connait un essor considérable, notamment en raison des liens établis entre les déséquilibres microbiens, appelés dysbioses, et certaines pathologies. En particulier, les dysbioses intestinales sont associées aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), aux désordres métaboliques liés à l'obésité et au diabète, ainsi qu'à plusieurs cancers et affections neurologiques (autisme, maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer) (Metwaly, Reitmeier, and Haller 2022). Cette thématique est abordée de façon plus approfondie dans la section « Lien avec les pathologies systémiques ».

Des approches thérapeutiques, comme la greffe de microbiote fécal, offrent des nouvelles perspectives prometteuses. Cette technique a notamment montré son efficacité pour prévenir les infections intestinales récurrentes à la bactérie *Clostridium difficile,* ouvrant la voie à de nouvelles stratégies de traitement pour diverses pathologies humaines (Baunwall et al. 2020).

Le microbiote cutané et le microbiote vaginal constituent également deux écosystèmes microbiens complexes et distincts, jouant des rôles essentiels à la protection des barrières épithéliales et la modulation du système immunitaire. Ces microbiotes assurent une défense active contre les agents pathogènes, favorisant ainsi la prévention des infections et le maintien de l'homéostasie locale. Le microbiote vaginal, en particulier, connaît des fluctuations importantes tout au long de la vie d'une femme, influencées par les variations hormonales associées à la puberté, la grossesse et la ménopause.

En cas de déséquilibre microbien, une dysbiose peut survenir, facilitant la prolifération de micro-ogranismes pathogènes, comme dans le cas de la vaginose bactérienne.

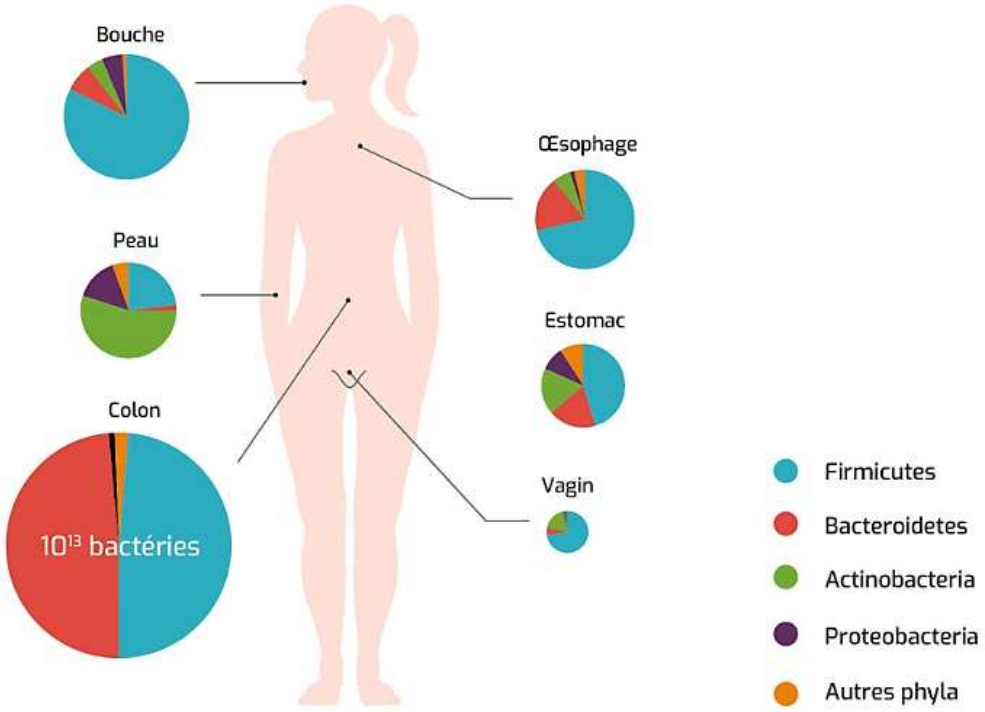


Figure 1 : Représentation des principaux microbiotes du corps humain.
Cette figure illustre la répartition de différents microbiotes humains dans diverses régions du corps, incluant le microbiote intestinal, cutané, oral, vaginal, gastrique et œsophagien. Chaque microbiote est composé de communautés microbiennes spécifiques, adaptées aux conditions locales (pH, humidité, composition des nutriments). Le microbiote intestinal, le plus volumineux, joue un rôle essentiel dans la digestion, la synthèse de vitamines et la régulation du système immunitaire. Le microbiote cutané assure une protection contre les pathogènes externes et contribue à la cicatrisation des plaies. Le microbiote vaginal, dominé par des espèces de Lactobacillus, maintien un environnement acide, jouant un rôle primordial dans la prévention des infections vaginales. Le microbiote oral, le plus diversifié, varie selon les niches écologiques spécifiques (langue, gencives, dents…). Le microbiote de l'estomac est principalement constitué de bactéries capables de résister à un environnement fortement acide, telles que Helicobacter pylori, bien que la diversité microbienne y soit plus limitée que dans d'autres régions du corps. Le microbiote de l'œsophage est lui aussi moins diversifié, mais joue un rôle clé dans la défense contre les pathogènes inhalés ou ingérés. Schéma adapté de : (Dethlefsen, McFall-Ngai, and Relman 2007)

1. Microbiote oral et lien avec le microbiote intestinal

Le microbiote oral, qui est l'objet principal de ce manuscrit de thèse, est situé à l'entrée du système digestif et des voies respiratoires. La cavité orale abrite un microbiote extrêmement diversifié qui est composé de milliers d'espèces bactériennes, virales, parasitaires et fongiques. Bien que stable en cas de bonne hygiène bucco-dentaire, cet équilibre est sensible aux influences de divers facteurs physiologiques et environnants. L'homéostasie buccale reflète ainsi l'état de santé global d'un individu, faisant de la cavité orale un miroir de la santé générale. Contrairement aux anciennes croyances qui prônaient une cavité buccale stérile (conduisant à un excès d'utilisation de bains de bouche antiseptiques), il est désormais reconnu que la diversité microbienne orale est cruciale pour la santé.

La cavité orale, en tant que site facilement accessible, permet des prélèvements répétés et non invasifs, ce qui en fait un modèle idéal pour l'étude de l'ensemble de l'organisme. Le microbiote oral, deuxième plus grand microbiote du corps humain après celui de l'intestin, influence également le microbiote intestinal (Figure 2). Cette interaction s'effectue par plusieurs voies : par voie entérale, les bactéries orales présentes dans la salive sont ingérées quotidiennement ; par voie sanguine, le microbiote buccal peut se propager dans la circulation systémique et migrer jusqu'au système intestinal ; et par voie des cellules immunitaires, où les bactéries buccales intracellulaires peuvent survivre au sein des cellules immunitaires et être transportées de la muqueuse buccale à la muqueuse intestinale *(Tan, Wang, and Gong 2023).*

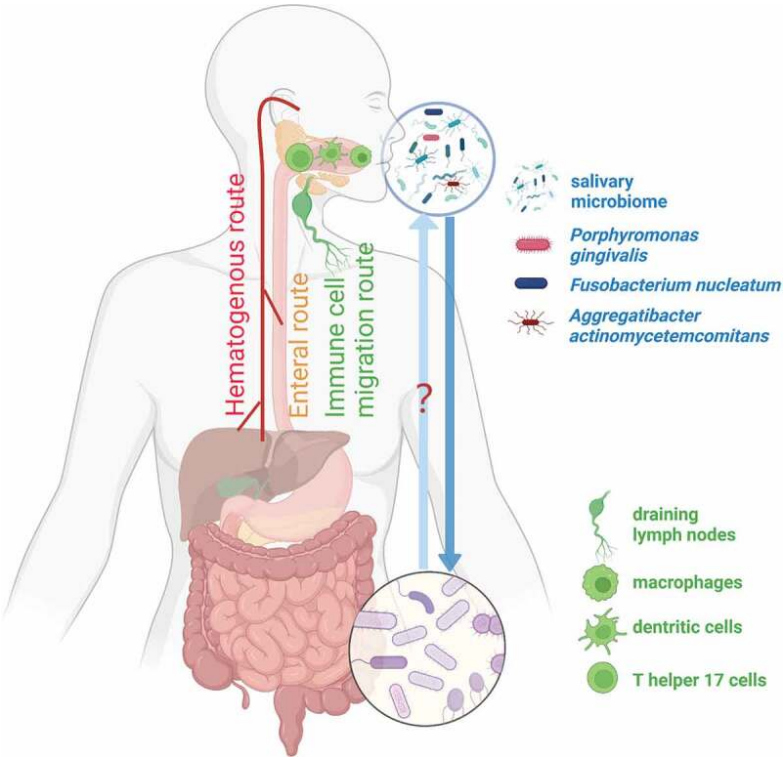


Figure 2 : Interactions et facteurs du microbiote oral influençant le microbiote intestinal.
Schéma illustrant les différentes voies par lesquelles le microbiote oral peut moduler la composition et l'activité microbiote intestinal. Certains pathogènes parodontaux, tels que Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum et Aggregatibacter actinomycetemcomitans, ont été détectés dans le microbiote intestinal, suggérant une migration possible de ces bactéries buccales vers l'intestin, pouvant induire une dysbiose intestinale (Tan, Wang, and Gong 2023).

2. Le microbiote oral

a. Composition et facteurs influençant le microbiote oral

Le microbiote oral comprend plus de 700 espèces bactériennes différentes pouvant coloniser toutes les niches écologiques composant la cavité orale. Chaque individu héberge à lui seul, environ 300 espèces bactériennes, constituant ainsi le microbiote oral unique à chacun. Il inclut également de nombreuses espèces fongiques comme les *Candida* et *Aspergillus*, une grande proportion de virus, notamment les bactériophages qui jouent un rôle important dans la régulation du microbiote oral ainsi que quelques archées et parasites. Chez les nourrissons, les personnes âgées ou immunodéprimées, l'accumulation de *Candida* peut provoquer des candidoses sévères (Dethlefsen, McFall-Ngai, and Relman 2007).

Il est essentiel de souligner que la cavité orale héberge plusieurs microbiotes distincts, reflétant à la fois la complexité anatomique de la bouche et la diversité des tissus qui la composent. Ces variations créent des niches écologiques spécifiques (gencive, langue, parodonte, dents, tissus immunitaires, glandes salivaires, prothèses, salive…), chacune caractérisée par des conditions environnementales propres. De ce fait, la composition et l'abondance des micro-organismes varient en fonction des sites analysés. Comme illustré dans la Figure 3, la cavité orale constitue un modèle d'étude pertinent, offrant la possibilité de cartographier à la fois le microbiote oral d'un site donné et celui propre à chaque individu. Cette figure met en lumière non seulement la richesse en diversité microbienne, mais aussi la notion de « carte d'identité » du microbiote oral, unique à chaque individu. En effet, pour une même zone de la cavité orale, des différences marquées dans la composition du microbiote entre les individus sont observées. Par ailleurs, la diversité microbienne peut varier d'un site à l'autre. Par exemple, des zones comme la gencive kératinisée ou la muqueuse buccale présentent une diversité plus faible, largement dominée par les *Streptococcus*, comparativement à d'autres sites comme la plaque dentaire, le dos de langue ou encore la salive, qui hébergent une diversité plus élevée.

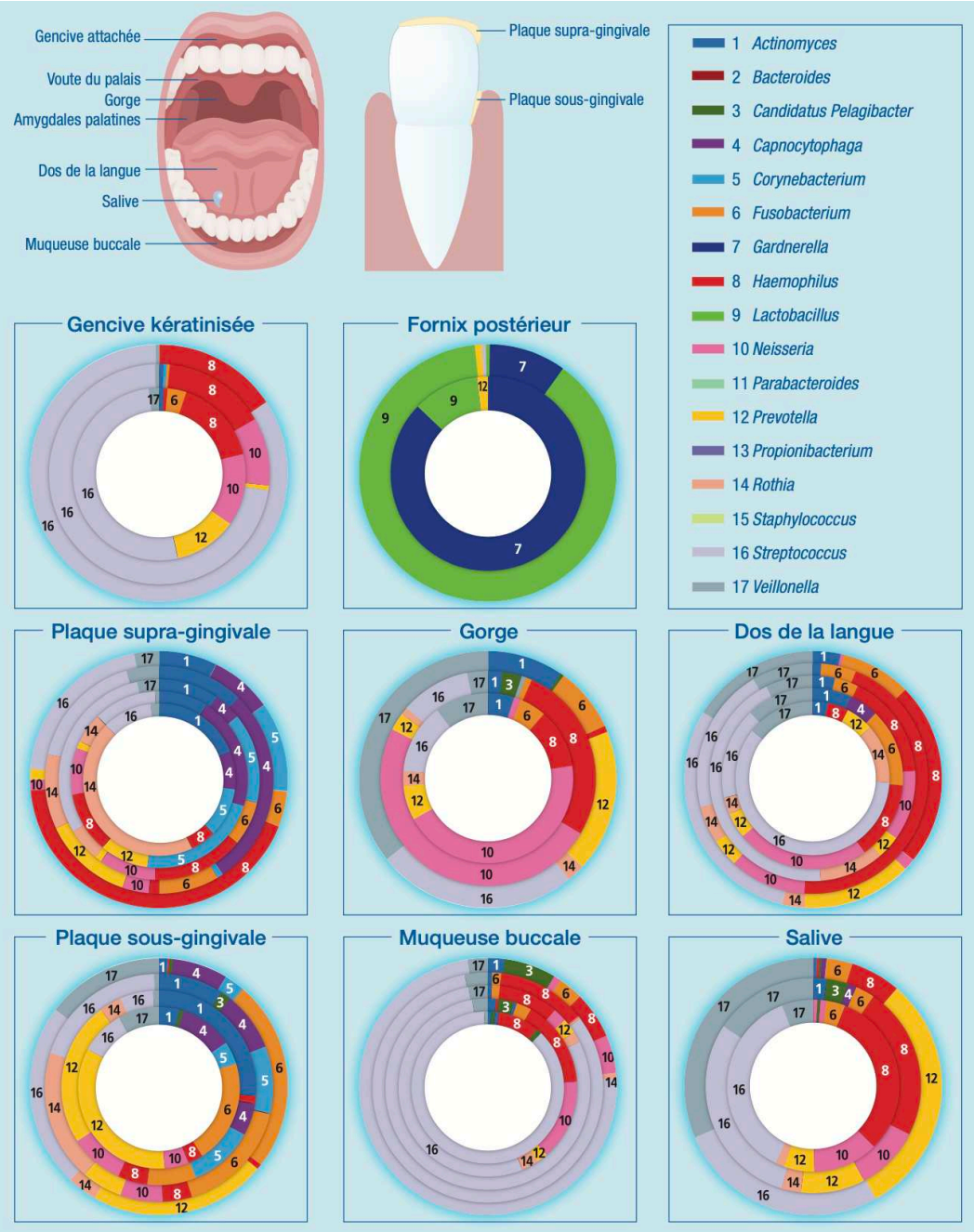


Figure 3 : Cartographie du microbiote oral selon les différentes niches écologiques de la cavité orale. Comparaison de la composition du microbiote oral entre deux à cinq individus, en fonction des différentes zones de la cavité buccale (gencive kératinisée, fornix postérieur, plaque supra ou sous-gingivale, gorge, dos de la langue, muqueuse buccale et salive). Chaque anneau représente un individu distinct, permettant d'illustrer la variabilité interindividuelle du microbiote au sein des différentes niches écologiques de la bouche ("La Revue Des Microbiotes N°8 : Parondontite & Maladies," n.d.).

De nombreux facteurs influencent la composition du microbiote oral (Figure 4). Le premier de ces

facteurs est l'âge ; en effet, la composition du microbiote oral évolue tout au long de la vie, depuis l'enfance jusqu'à la vieillesse. Ces modifications sont principalement liées à l'apparition des dents chez les nourrissons, aux changements de régime alimentaire au fils des âges, ainsi qu'aux variations hormonales. Les facteurs génétiques et le fonctionnement du système immunitaire, propres à chaque individu, exercent également une influence majeure sur la composition du microbiote oral. D'autres facteurs, tels que le mode de vie, l'alimentation ou le tabagisme, peuvent également modifier la composition du microbiote oral et constituer des facteurs aggravants pour les maladies parodontales (Tonetti et al. 2017), (Leite et al. 2018). Cependant, l'hygiène bucco-dentaire reste l'un des facteurs les plus déterminants. Chaque brossage élimine une partie du biofilm oral, cette fine couche de micro-organismes adhérant à la surface des dents, réduisant ainsi la charge microbienne dans la bouche et contribuant à la prévention de l'accumulation de plaque dentaire.

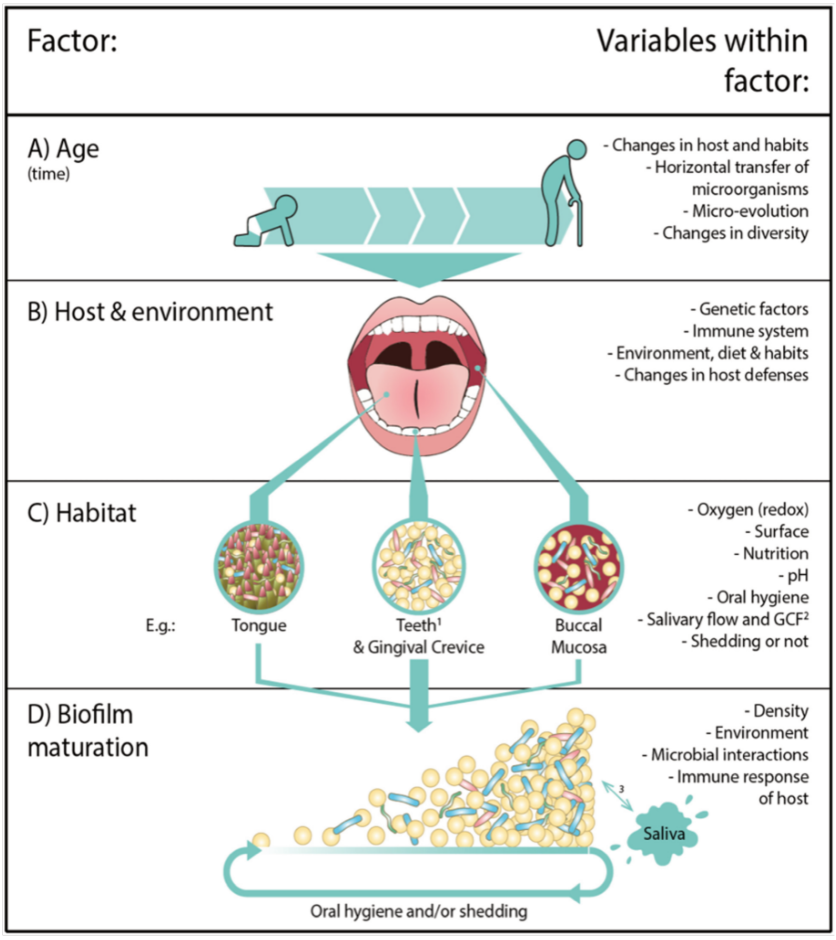


Figure 4 : Les principaux facteurs impliqués dans la composition du microbiote oral.
(A) Age ; La diversité du microbiote oral évolue avec l'âge de l'hôte (éruption dentaire, changements hormonaux…). (B) L'hôte et son environnement ; la génétique, l'immunité, le mode de vie et

l'alimentation de chaque personne influencent le microbiote oral. (C) Habitat ; Les niches buccales varient selon l'oxygène, le pH et la nutrition, regroupant des micro-organismes spécifiques. (D) Maturation du biofilm ; Les biofilms matures diffèrent des biofilms en formation en raison de changements environnementaux internes, d'interactions microbiennes (quorum sensing), et de la réponse immunitaire de l'hôte. L'hygiène dentaire joue un rôle clé dans l'élimination du biofilm oral (Rosier, Marsh, and Mira 2018).

b. Le biofilm

Le biofilm, ou plus communément appelé plaque dentaire, est un dépôt mou et adhésif formé par les micro-organismes en continu sur les surfaces des dents. Il est principalement constitué de bactéries, de leurs produits métaboliques, de restes alimentaires, de cellules mortes et de mucus provenant de la salive (Figure 5). Après chaque brossage, une fine pellicule de protéines salivaires se dépose sur les dents, à laquelle les bactéries orales adhèrent. Au fur et à mesure que ces bactéries s'accumulent, elles sécrètent une matrice extracellulaire polysaccharidique, formant un biofilm. Cette matrice protège les bactéries et renforce leur adhérence à la surface des dents. Avec le temps, la plaque dentaire devient de plus en plus complexe, favorisant la prolifération de diverses espèces microbiennes. En cas d'accumulation excessive, les bactéries présentes dans la plaque dentaire peuvent produire des acides qui déminéralisent l'émail des dents, conduisant à la formation de caries. De plus, si la plaque n'est pas éliminée régulièrement par un brossage efficace, elle peut provoquer une inflammation gingivale, aboutissant à l'apparition de maladie parodontale (détaillée dans la section « Maladies orales : maladies parodontales et caries dentaires »).

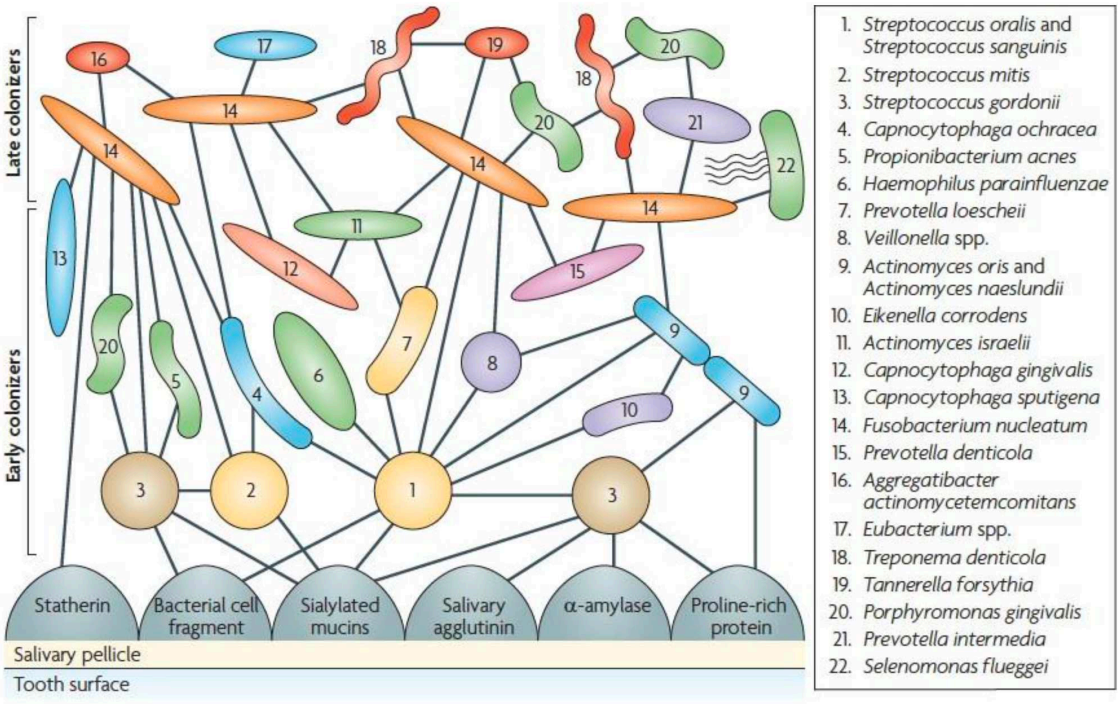


Figure 5 : Formation et dynamique du biofilm oral.

Le biofilm oral est une structure complexe composée d'une matrice extracellulaire riche en polysaccharides, renfermant des bactéries, des débris cellulaires, des résidus alimentaires et de la salive. Il adhère aux surfaces dentaires, formant une barrière protectrice pour les micro-organismes qu'il abrite. La formation du biofilm est un processus hiérarchisé, débutant par l'adhésion des colonisateurs primaires, suivie de l'intégration de colonisateurs secondaires et tertiaires, créant ainsi une structure multicouche hautement organisée. Cette organisation confère au biofilm une résistance aux agressions externes, notamment les traitements antimicrobiens et les forces mécaniques (Kolenbrander et al. 2010).

c. Équilibre et déséquilibre du microbiote oral : eubiose et dysbiose

L'eubiose microbienne (Figure 6) correspond à l'état d'équilibre optimal du microbiote, essentiel pour maintenir une bonne santé et prévenir diverses maladies (Dethlefsen, McFall-Ngai, and Relman 2007). Dans des conditions saines et homéostatiques, le microbiote est composé d'une diversité d'organismes dont on sait qu'ils sont bénéfiques au développement et à la santé de l'hôte. Les principales caractéristiques de l'eubiose sont relatives à une grande diversité de micro-organismes, qui respecte un bon équilibre entre les espèces bénéfiques et celles potentiellement pathogènes. Les micro-organismes commensaux assurent une fonction clé en stimulant de manière continue et modérée le système immunitaire, jouant ainsi un rôle de veille immunitaire, aidant à la mise en place d'une réponse immune adaptée, tout en évitant une activation excessive (Routy et al. 2018). Le biofilm eubiotique

participe aussi activement à la prévention des infections en limitant la prolifération des pathogènes par un phénomène de compétition pour les ressources telles que les nutriments et l'espace. Par ailleurs, les bactéries commensales produisent des métabolites bénéfiques, notamment les acides gras à chaîne courte (AGCC), qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires et servent de source d'énergie aux cellules intestinales, contribuant ainsi au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale.

A l'opposé, la dysbiose microbienne désigne un déséquilibre au sein du microbiote, caractérisé par une réduction des espèces bénéfiques, une prolifération des pathobiontes et une diminution de la diversité microbienne. Cette perturbation entraine une domination des pathobiontes, qui peut induire une inflammation chronique et favoriser le développement de pathologies diverses.

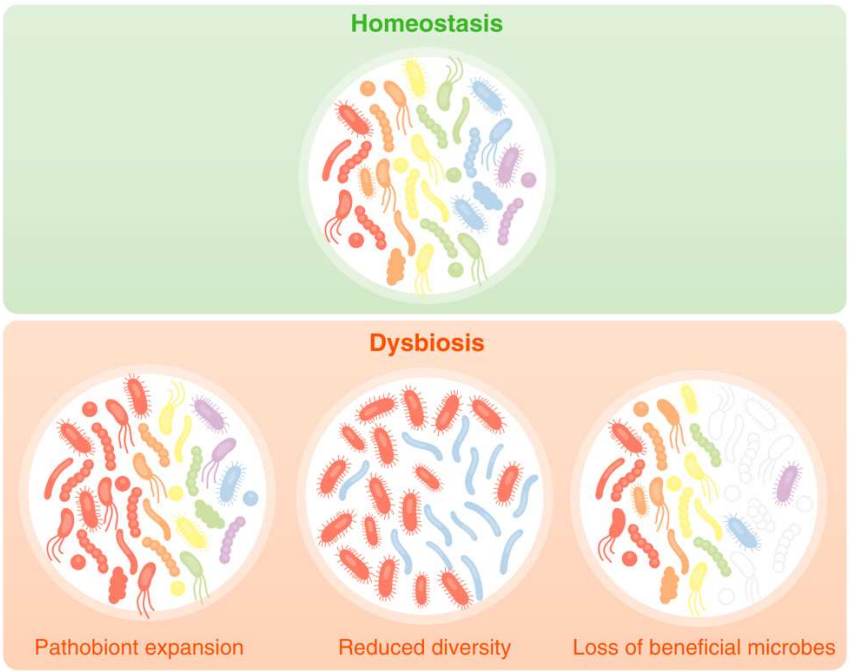


Figure 6 : Dysbiose : Mécanismes et conséquences du déséquilibre microbien
En conditions d'homéostasie, le microbiote est composé d'une communauté diversifiée de micro-organismes jouant un rôle fondamental dans le développement, la régulation immunitaire et le maintien de la santé de l'hôte. Toutefois, des perturbations environnementales peuvent altérer la structure et la composition de cette communauté microbienne. Ces perturbations se manifestent par une diminution de la diversité des micro-organismes bénéfiques et par la prolifération excessive de commensaux opportunistes, appelés pathobiontes, capables de causer des dommages. La domination du microbiote par ces pathobiontes au sein du microbiote peut déclencher des réponses inflammatoires, favorisant ainsi l'apparition de diverses pathologies, allant de l'inflammation chronique à des maladies systémiques (Petersen and Round 2014).

La formation du biofilm oral et donc de la dysbiose du microbiote oral est responsable des deux pathologies orales les plus communes chez l'homme : la maladie carieuse et les maladies parodontales. Notre laboratoire suppose que l'établissement d'une « signature microbiologique et immunitaire » pourrait permettre de définir une cartographie orale selon des profils de patients. Cela pourrait inclure les patients à risque de certaines pathologies (orales ou systémiques) ou ceux ayant un mode de vie particulier, comme les sportifs de haut niveau par exemple.

II. Les maladies orales : maladies parodontales et caries dentaires

La cavité orale est une entité essentielle et polyfonctionnelle remarquable, assurant des fonctions variées comme manger, parler, respirer, sourire… Cette entité est d'autant plus complexe qu'elle est située en amont du tractus digestif et des voies respiratoires assurant un rôle de barrière protectrice, permettant le contrôle et la défense de l'intégrité de l'organisme.

Cependant, les maladies bucco-dentaires affectent près de 3,5 milliards de personnes dans le monde, selon le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en mars 2022. Ces affections touchent de manière disproportionnée puisque les ¾ des personnes affectées par ces maladies vivent dans des pays à revenu intermédiaire (World Health Organization 2022). De plus, il existe une corrélation très forte et constante entre le statut socio-économique (revenu, profession et niveau d'instruction) et la prévalence ainsi que la gravité des maladies et affections bucco-dentaires. Par ordre d'incidence, les principales pathologies buccales sont les caries dentaires, les maladies parodontales (parodontite et gingivite), l'édentation complète et les cancers de la bouche. Ces affections bucco-dentaires sont associées à des facteurs de risque communs à plusieurs maladies non transmissibles (MNT), notamment la consommation de sucre, de tabac, et d'alcool, ainsi que les mauvaises pratiques d'hygiène. La majorité des affections bucco-dentaires sont donc largement évitables et pourraient être traitées à un stade précoce.

1. La parodontite

La parodontite représente l'une des pathologies inflammatoires chroniques les plus fréquentes chez l'Homme. Environ 19% de la population adulte mondiale, soit plus d'un milliard de personnes dans le monde, souffrent de parodontites sévères (World Health Organization 2022), et son incidence augmente de manière significative avec l'âge. Une étude menée aux USA a révélé que 64% des

personnes âgés de plus de 65 ans souffrent de parodontite modérée à sévère (Eke et al. 2015). Cependant, cette maladie ne se limite pas aux personnes âgées. Cependant, cette maladie affecte également les jeunes adultes, comme en témoigne l'étude réalisée par l'enquête nationale NPASES en 2007 auprès d'une population française âgés de 35 à 64 ans *(National Periodontal and Systemic Examination Survey)*, qui a montré que 47% des participants (n= 2144) présentaient une parodontite modérée à sévère (Bourgeois, Bouchard, and Mattout 2007).

La parodontite est une pathologie complexe dont l'étiologie est éminemment plurifactorielle. Outre le facteur lié à l'âge, plusieurs autres éléments peuvent agir comme facteurs de risque, favorisant l'apparition et la progression de ces maladies parodontales. Parmi ceux-ci, une hygiène bucco-dentaire insuffisante, la consommation de tabac, ainsi que des prédispositions génétiques jouent un rôle majeur. De plus, la présence de maladies systémiques, le stress chronique, une consommation excessive d'alcool, et une alimentation déséquilibrée sont également impliqués dans le développement de ces pathologies orales. L'interaction de ces facteurs, pris individuellement ou combinés, peut considérablement augmenter le risque de maladies parodontales. Il en découle une importance cruciale de maintenir une hygiène bucco-dentaire rigoureuse et d'effectuer des visites régulières chez le dentiste pour une prévention efficace.

Cette pathologie inflammatoire chronique qui détruit, sur plusieurs années, les tissus de soutien de la dent formant le parodonte, entraine une mobilité puis le déchaussement des dents. Toutefois, cette maladie est principalement identifiée comme étant une maladie inflammatoire liée à une prolifération de plusieurs agents infectieux, principalement des bactéries anaérobies à Gram négatifs qui colonisent les tissus gingivaux et sous-gingivaux autour des dents et modifient l'équilibre commensal du biofilm sain (cette partie est développée dans la section « Étiopathogénie des maladies parodontales »). La gencive devient alors rouge, peut saigner spontanément ou lors du sondage, et présente un œdème localisé. L'attache épithélio-conjonctive entre la gencive et la dent se dégrade et migre plus bas le long de la racine, créant une poche parodontale qui peut être envahie par de nombreuses bactéries (Figure 7). La mesure de la profondeur de la poche parodontale constitue un critère objectif important qui permet d'évaluer la sévérité de l'atteinte parodontale. A l'état sain, le sillon sulculaire présente une profondeur moyenne de 2 à 3 mm, alors qu'une profondeur de 4 à 6 mm correspond à une progression vers un stade modérée, et au-delà de 7mm indique une parodontite sévère. En 2017, une nouvelle classification des maladies parodontales (Classification de Chicago) a été établie, les catégorisant en 4 stades (I à IV) et 3 grades de gravité (A, B, C).

De plus, l'implication de virus et en particulier, les *Herpesvirus* humain (HHV) est également fortement suspecté (détaillé dans la section « Implication des *Herpesvirus* humain dans les pathologies

orales »). Une conséquence majeure et irréversible de cette pathologie est la destruction des tissus de soutien de la dent, en particulier l'os alvéolaire et le ligament parodontal, entrainant le déchaussement et la perte de la dent. En raison de sa forte incidence et de son impact significatif sur la santé bucco-dentaire et systémique, cette maladie est une priorité mondiale en matière de santé publique. Le traitement actuel de la parodontite est essentiellement sur des soins préventifs, sur le respect d'une hygiène bucco-dentaire régulière et soignée. La prise en charge thérapeutique repose sur des actions mécaniques de nettoyage parodontal / surfaçage radiculaire et parfois accompagné d'un curettage chirurgical des tissus sub-gingivaux dans les situations les plus sévères. La prescription d'un traitement antibiotique et de bains de bouche peut être nécessaire. Ces traitements permettent de stabiliser temporairement la maladie et de ralentir son évolution, malgré de fréquentes récidives, notamment dans les formes sévères de la maladie. Il n'existe pas encore à ce jour de traitement curatif de la parodontite.

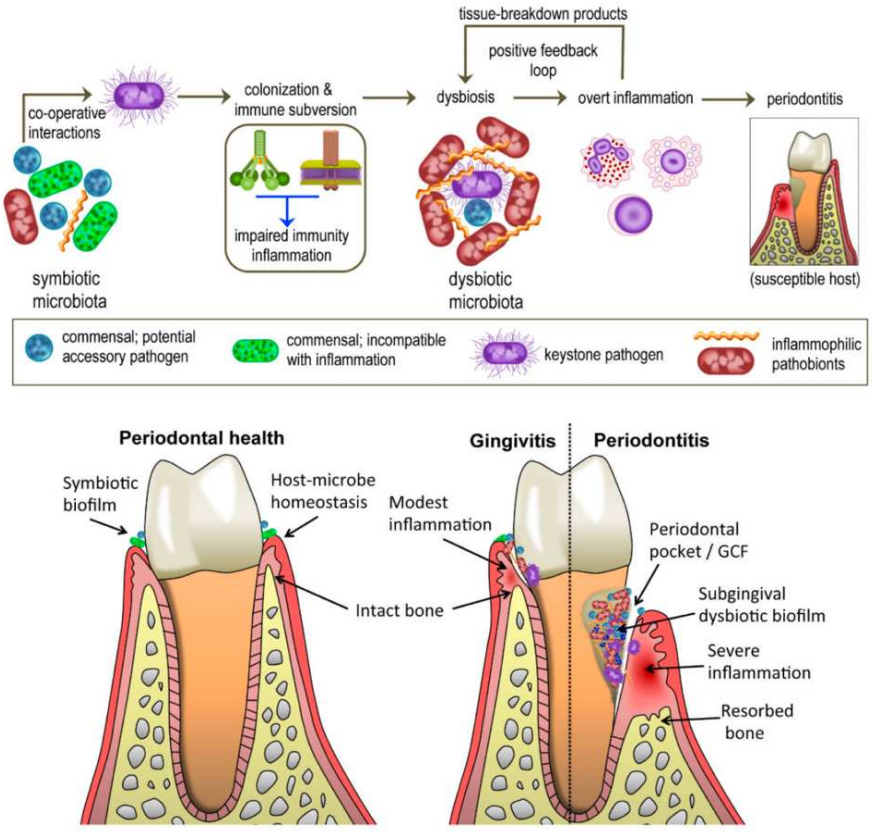


Figure 7 : Synergie polymicrobienne et dysbiose dans la parodontite.

Schéma illustrant le rôle d'une communauté polymicrobienne dans le développement des maladies parodontales. Les micro-organismes pathogènes agissent en synergie pour déclencher une inflammation destructrice des tissus. Les pathogènes clés, tels que Porphyromonas gingivalis, soutenus par d'autres pathogènes, perturbent la réponse immunitaire de l'hôte, entrainant à un état de dysbiose. Ce microbiote dysbiotique exacerbe l'inflammatoire locale, provoquant la destruction

progressive des tissus parodontaux, notamment la résorption de l'os alvéolaire. L'interaction entre inflammation et dysbiose forme un cercle vicieux, où les débris tissulaires issus de l'inflammation nourrissent davantage le microbiote pathogène, renforçant ainsi la destruction tissulaire (Hajishengallis 2015).

a. La parodontite, facteur de risque des pathologies systémiques :

Outre son impact sur la perte des dents, les données épidémiologiques, cliniques et biologiques accumulées ces deux dernières décennies mettent en évidence que les maladies parodontales exercent une influence délétère sur certaines maladies systémiques. D'autre part, des pathologies générales aggravent également l'évolution et la sévérité des parodontites (Lalla and Papapanou 2011), (Bui et al. 2019). En plus de l'altération de la santé bucco-dentaire et du bien-être psychosocial, la parodontite est aussi considérée comme un facteur indépendant aggravant pour plusieurs dizaines de maladies systémiques (Figure 8).

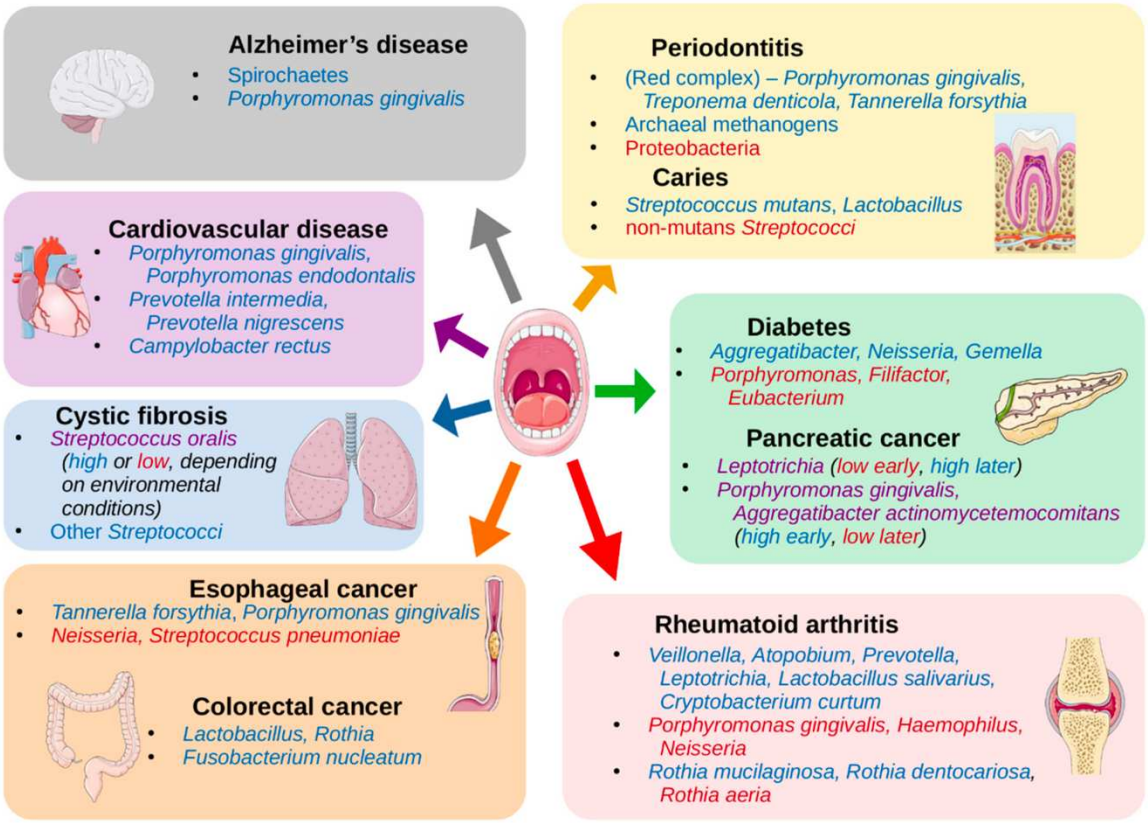


Figure 8 : *Pathologies orales et systémiques associées aux modifications du microbiote oral.*

Cette figure illustre les liens entre le microbiote oral et diverses maladies systémiques. Les micro-organismes représentés en bleu sont ceux dont l'abondance a augmentée dans la cavité buccale des personnes atteintes la maladie correspondante ; alors que les micro-organismes en rouge sont ceux ayant vu leur abondance diminuée dans la cavité orale des personnes atteintes de la maladie notée. Les micro-organismes en violet sont ceux dont l'abondance varie (augmentée ou diminuée) en fonction de la progression de la maladie (Willis and Gabaldón 2020).

La santé bucco-dentaire ne concerne pas seulement la cavité orale, mais peut aussi avoir un impact sur la santé systémique. La théorie de l'infection focale suggère que les bactéries pathogènes et les inflammations présentes dans la cavité orale peuvent avoir des répercussions ailleurs dans le corps par l'atteinte de certains organes ou tissus du corps appelé locus minoris resistentiae (LMR) (lieux de moindre résistance) (Figure 8). Les micro-organismes pathogènes responsables des maladies orales peuvent entrer dans la circulation sanguine et se disséminer vers des sites éloignés, où ils peuvent provoquer des infections ou exacerbant des affectations préexistantes. En effet, cette dissémination contribue à l'augmentation de l'inflammation systémique et/ou locale, notamment au sein du LMR. Ce processus peut perturber l'équilibre immunitaire et aggraver près de 57 maladies systémiques (Loos 2016), (Sabharwal et al. 2018).

Ci-après est présenté un résumé des principales maladies concernées :

- Maladies cardiovasculaires : Les patients atteints de parodontites sévères présentent un risque accru d'hypertension artérielle (Martin-Cabezas et al. 2016), d'athérosclérose (Almeida et al. 2017) et de maladie coronarienne (Tonetti, Van Dyke, and working group 1 of the joint EFP/AAP workshop 2013). Par ailleurs, des bactéries parodontales été retrouvées dans des cas d'endocardites infectieuses (Podglajen and Mainardi 2007).
- Bronchopneumopathie chronique obstructive : Le biofilm buccal, réservoir de pathogènes, favorise la colonisation des tissus pulmonaires et la contamination des voies respiratoires inférieures. Une étude menée sur 10 645 patients a mis en évidence une corrélation entre la parodontite sévère et une fonction pulmonaire altérée (Lee et al. 2020).
- Polyarthrite rhumatoïde : Il existe une association statistique entre la polyarthrite rhumatoïde et la parodontite chronique (Bartold and Lopez-Oliva 2020). Un traitement parodontal initial peut réduire l'activité des marqueurs de la polyarthrite rhumatoïde (Cosgarea et al. 2018).
- Le diabète : La parodontite est reconnue comme étant la sixième complication du diabète. Les personnes atteintes de parodontite ont un contrôle glycémique moins efficace et un risque accru de développer un diabète. Les patients diabétiques affectés par la parodontite présentent

également un contrôle glycémique plus altéré et une incidence plus élevée de complications liées au diabète (Lalla and Papapanou 2011).

- Complications de la grossesse : Les issues défavorables, telles que la prééclampsie, les accouchements prématurés (< 37 semaines), les nouveau-nés de faible poids (< 2,5 kg), et les décès fœtaux, sont plus fréquents chez les femmes atteintes de parodontite. Ces complications seraient liées à la dissémination hématologique de micro-organismes oraux, entrainant une réponse inflammatoire au sein de l'environnement fœto-placentaire (Figuero, Han, and Furuichi 2020).
- La maladie d'Alzheimer : Un lien a été établi entre la parodontite et la maladie d'Alzheimer. La diffusion d'agents infectieux ou inflammatoires de la cavité orale vers le cerveau est une hypothèse crédible (Ashraf et al. 2019). Des bactéries parodonto-pathogènes, leurs toxines et certains virus de la famille des HHV ont été identifiés dans la cavité buccale et sont capables d'infiltrer les tissus neuronaux, où ils peuvent jouer un rôle dans l'inflammation cérébrale (Dioguardi et al. 2020). Des agents infectieux oraux ont même été retrouvés dans les tissus cérébraux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer (Lövheim et al. 2018).
- Cancers colorectaux : l'incidence de la parodontite est significativement plus élevée chez les patients ayant un cancer colorectal, avec une hausse du risque d'un diagnostic de cancer d'environ 50 % plus élevé que chez les contrôles. Ce risque accru n'est pas affecté par d'autres paramètres reconnus pour favoriser le développement de ces cancers (consommation de charcuteries et d'alcool, historique familial de cancer et sédentarité, entre autres). Ces observations suggèrent fortement que la parodontite pourrait représenter un facteur de risque indépendant dans l'étiologie du cancer colorectal (Janati et al. 2020).

2. La gingivite

La gingivite est une inflammation gingivale temporaire, souvent considérée comme le stade initial de la parodontite si elle n'est pas traitée. Au cours de la gingivite, l'attache épithélio-conjonctive entre la dent et la gencive est préservée, protégeant les tissus sous-gingivaux d'une invasion microbienne. Sans doute lié à cela, la guérison peut être obtenue par la simple élimination de la plaque dentaire supra-gingivale. Il est intéressant de noter que la gingivite peut être induite expérimentalement chez des volontaires qui se sont abstenus d'une hygiène bucco-dentaire normale pendant une courte période. La maladie se résorbe généralement dès la reprise d'une hygiène bucco-dentaire normale et régulière (Kistler et al. 2013).

L'évolution vers une maladie parodontale chronique est marquée par la rupture de l'étanchéité

épithéliale et l'atteinte des tissus plus profonds (Figure 7), se manifestant par des poussées inflammatoires alternant avec des phases de latence de quelques mois à plusieurs années. Ainsi, gingivite et parodontite constituent donc deux entités distinctes. Un patient atteint de gingivite peut guérir complètement, tandis qu'un patient atteint de parodontite reste affecté de manière permanente, même après un traitement efficace, et nécessitera un suivi parodontal à vie pour prévenir les récidives. Mieux comprendre le fonctionnement de la parodontite apparaît donc comme une priorité essentielle pour améliorer le traitement des patients de cette maladie.

3. La carie dentaire

Selon le rapport sur la charge mondiale de morbidité en 2019 (Bernabe et al. 2020), les caries non traitées des dents définitives constituent l'affection bucco-dentaire la plus courante. Près de 2 milliards de personnes souffrent de caries sur les dents définitives et 514 millions d'enfants de caries des dents de lait (World Health Organization 2022).

La combinaison de différents facteurs peut entrainer la déminéralisation de l'émail dentaire et la formation de cavités, qui sont les signes caractéristiques des caries dentaires (Figure 8). L'excès de sucres agit comme un stress environnemental, provoquant une transition pathogénique du biofilm oral. Les bactéries présentes dans la plaque dentaire métabolisent les sucres alimentaires, produisant des acides. Ces acides attaquent l'émail dentaire et peuvent progressivement créer des cavités. Une forte consommation de sucres favorise ainsi la prolifération des bactéries acidogéniques et aciduriques (Marsh 2009). Une hygiène bucco-dentaire insuffisante, avec notamment un brossage inadéquat, peut entrainait une accumulation de plaque dentaire, rendant les dents plus vulnérables aux caries. Des facteurs génétiques peuvent également intervenir, certaines personnes étant plus susceptibles de développer des caries en raison de la présence de sillons, de la composition de leur émail dentaire ou de leur salive. Une salive insuffisante ou de mauvaise qualité ne peut pas neutraliser les acides et reminéraliser les dents efficacement.

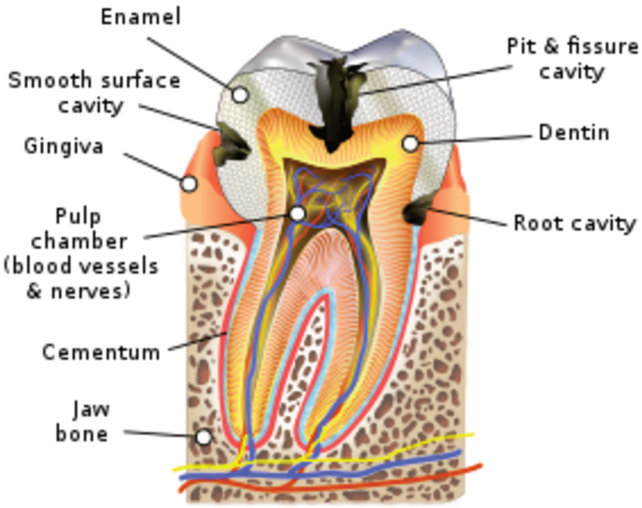


Figure 8 : Schéma d'une dent affectée par une carie dentaire.
Ce schéma illustre les différentes structures d'une dent et met en évidence les effets d'une carie sur les tissus dentaires. Le processus carieux débute par une déminéralisation de l'émail, la couche protectrice externe, due aux acides produits par les bactéries de la plaque dentaire, telles que Streptococcus mutans. Si elle n'est pas traitée, la carie progresse en traversant la dentine, une couche plus poreuse et moins minéralisée, et peut atteindre la pulpe dentaire, riche en nerfs et en vaisseaux sanguins ("Tooth Decay" 2024).

III. Étiopathogénie des maladies parodontales

Les maladies parodontales sont généralement considérées comme des pathologies d'origine multifactorielle. Cependant, il existe un consensus selon lequel les maladies parodontales sont principalement dues à la prolifération de bactéries parodontales qui se développent dans la plaque dentaire, au détriment du biofilm « sain ». Le biofilm est en interaction constante avec son environnement, ce qui peut entrainer des variations de sa composition. La composition du biofilm est essentielle pour l'équilibre du microbiote oral et, par conséquent, la santé buccale. Les surfaces dentaires et gingivales de la cavité buccale sont continuellement exposées à la salive et au fluide gingival, créant un milieu humide et chaud favorable à la croissance de divers micro-organismes, à l'origine de la formation de ce biofilm (Marsh 2009). Sans une élimination adéquate de cette plaque dentaire**,** une dysbiose apparait, provoquant une modification de la flore microbienne dite « normale » entraînant une rupture des relations bénéfiques avec l'hôte, compromettant ainsi sa santé (Sanz et al. 2017). Cette dysbiose déclenche une réaction immunitaire de l'hôte et l'établissement d'un état inflammatoire sous-gingival. Plusieurs auteurs proposent des approches que l'établissement d'une « signature microbiologique » de la dysbiose pourrait permettre de définir une cartographie orale selon

des profils de patients (Meuric et al. 2017) (T. Chen, Marsh, and Al-Hebshi 2022) (Valm 2019). De plus, la bouche est un site facile d'accès, permettant des prélèvements répétés et non invasifs, ce qui en fait un modèle idéal pour l'étude de l'ensemble de l'organisme.

Les maladies parodontales sont le résultat d'une interaction complexe entre le microbiote oral et l'hôte, où la distinction entre une flore microbienne pathogène et commensale est difficile à établir. Les critères de causalité définis par Koch ou Hill présentent des discordances, rendant difficile l'attribution d'un véritable critère de causalité à une seule espèce bactérienne (S. Socransky and Haffajee 1992). Plus de 300 espèces bactériennes ont été isolées de la poche parodontale, mais seul un faible pourcentage de celles-ci, telles que *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Tannerella forsythia*, sont fréquemment associées à la maladie parodontale et à sa progression. Cependant, ces bactéries peuvent également être présentes dans le microbiote oral commensal sans forcément être pathogènes. Par exemple, Riep et al. ont montré que *P. gingivalis* et *T. forthysia* pouvaient aussi être isolées à partir de sites sains (Kato et al. 2015). De plus, Kumar et al. ont observé que le genre bactérien à Gram négatif *Veillonella* était associé à la santé parodontale, tandis que la bactérie à Gram positif anaérobie *Filifactor alocis* était associée à la maladie parodontale (Schlafer et al. 2010).

1. La théorie de Socransky

A partir des années 1970, malgré des progrès significatifs dans l'identification des bactéries impliquées dans les maladies parodontales, aucune espèce bactérienne, suspectée comme possible pathogène majeur, n'a pu être retrouvée à des concentrations dépassant les 3% dans les gingivites et les parodontites (Moore et Moore, 1994). Cette observation a conduit à une révision des conceptions traditionnelles, donnant naissance à l'idée d'infections polymicrobiennes, où l'association de plusieurs espèces bactériennes a commencé à prendre son ampleur. Socransky et ses collaborateurs, en analysant la plaque sous-gingivale de patients atteints de parodontite chronique, ont proposé une classification des bactéries par complexes, chacun identifié par une couleur spécifique (Socransky et al. 1998). Cette classification repose sur la pathogénicité des bactéries, leur rôle dans l'inflammation et leur contribution au développement des maladies parodontales, telles que la parodontite et la gingivite. Le maintien d'un équilibre entre ces complexes est essentiel pour une bonne santé parodontale, tandis qu'un déséquilibre peut favoriser l'apparition de maladies buccales (Figure 9).

Le complexe jaune est principalement constitué de bactéries Gram positives du genre *Streptococcus* (par exemple : *S. oralis*, *S. salivarius*). Ces bactéries pionnières sont les premières à coloniser les surfaces dentaires, initiant la formation du biofilm oral et facilitant l'adhérence d'autres micro-

organismes (Abranches et al. 2018).

Le complexe vert (par exemple : *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*) comprend des bactéries considérées comme relativement inoffensives, voire bénéfiques, contribuant à maintenir l'équilibre du microbiote oral (eubiose).

Le complexe orange (par exemple : *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*) est composé de bactéries généralement associées à des formes modérées de maladies parodontales. Leur augmentation dans la plaque dentaire peut provoquer une inflammation gingivale et aggraver les maladies parodontales, souvent en addition avec les bactéries du complexe rouge.

Ce complexe rouge est formé par un trio de bactéries anaérobies buccales comprenant *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia*, est traditionnellement reconnu pour son rôle étiologique majeur dans la parodontite. Récemment, *Filifactor alocis*, une nouvelle bactérie parodontopathogène, a été ajoutée à ce trio (Aja et al. 2021). Ces bactéries parodontopathogènes sont considérées comme des bactéries clés de voute, qui expriment de nombreux facteurs de virulence et sont capables d'envahir et de détruire les tissus parodontaux en colonisant l'espace sous-gingival.

L'inflammation provoquée par ces bactéries affaiblit le système immunitaire de l'hôte et entraine une réponse immuno-destructice, aboutissant à la destruction des tissus parodontaux par des facteurs pro-inflammatoires, des enzymes protéolytiques et une infiltration massive de cellules immunitaires dans la poche parodontale (Cochran 2008). Ce processus inflammatoire cause des altérations des épithélia parodontaux et osseux conduisant aux maladies parodontales (Page and Kornman 1997). La présence des bactéries du complexe rouge dans un site parodontal n'entraine pas systématiquement une inflammation irréversible, ce qui suggère l'intervention de cofacteurs aggravants. Il est donc crucial de souligner que le modèle des complexes de Socransky est simplifié et que depuis sa création en 1998, les avancées technologiques en microbiologie orale ont enrichi notre compréhension des communautés microbiennes orales et des pathologies associées.

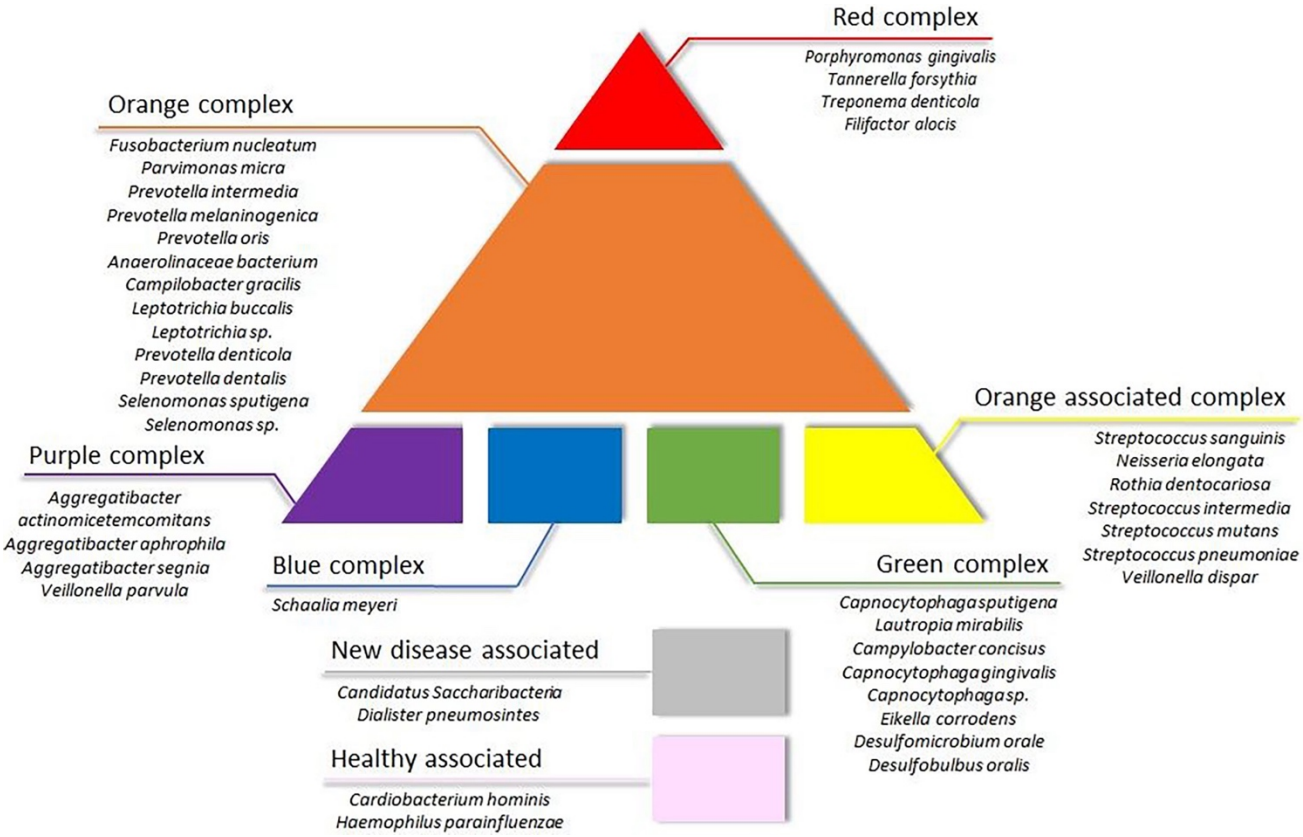


Figure 9 : Schéma actualisé des complexes microbiens oraux selon la classification de Socransky. Les groupes bactériens sont représentés par des couleurs distinctes, reflétant leur rôle dans les complexes microbiens associés à la pathogénie orale. Cette classification mise à jour met en évidence leur implication dans l'équilibre entre la santé bucco-dentaire et le développement de maladies orales. Ce schéma illustre ainsi la diversité et la complexité des interactions microbiennes au sein du biofilm oral (Wirth et al. 2021).

IV. Implication des *Herpesvirus* humain dans les pathologies orales

Si la dysbiose bactérienne gingivale constitue un facteur contributif majeur dans l'apparition et la progression des pathologies orales, ce modèle présente certaines limites cliniques et biologiques. Cela suggère que d'autres facteurs étiologiques sont également impliqués et aggravent ces maladies. Au cours des années 1990, des études ont démontré que les lésions parodontales étaient souvent infectées par certains *Herpesvirus* humains (HHV) (Contreras and Slots 2000).

Les *Herpesviridae* forment une famille diversifiée de virus très répandus dans le monde animal, avec un large spectre d'hôtes allant des mollusques aux vertébrés supérieurs. Ils sont caractérisés par une enveloppe virale, une capside icosaédrique, et d'un génome ADN double brin codant pour environ une

centaine de gènes (Figure 10) (Yuan et al. 2018).

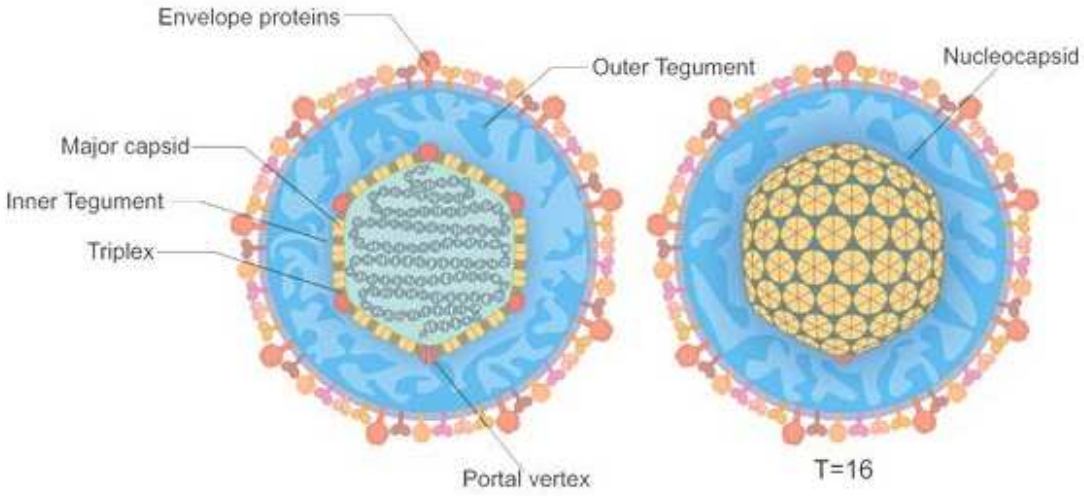


Figure 10 : Structure détaillée des Herpesvirus : organisation et composants fonctionnels
Cette figure illustre la structure complexe des Herpesvirus. Le génome viral est constitué d'une molécule d'ADN double brin, linéaire et non segmentée dont la taille varie entre 120 et 250 kbp, codant pour environ 70 à 200 gènes. La nucléocapside contient l'ADN viral et est entourée d'une capside icosaédrique mesurant 100 nm de diamètre, constituée de 162 capsomères. Entre la capside et l'enveloppe se trouve le tégument, une matrice contenant diverses protéines, incluant des enzymes virales et des protéines régulatrices impliquées dans le cycle de réplication. L'enveloppe externe, dérivée de la membrane cellulaire de l'hôte, est composée d'une douzaine de glycoprotéines virales spécifiques. Cette enveloppe est sphérique à pléomorphe, a un diamètre de 150 à 200 nm et une symétrie icosaédrique T=16. ("Herpesviruses Overview: Structure, Classification, Transmission, Treatment," n.d.)

L'une des principales propriétés des HHV est leur capacité à persister à vie chez leur hôte, grâce à une stratégie sophistiquée d'évasion à la surveillance immunitaire. Cette situation est rendue possible par une propriété essentielle des HHV qui sont capables de persister silencieusement dans l'organisme sous forme latente, puis de se propager rapidement au cours de phase de réplication active. Cette adaptation repose principalement sur un équilibre subtil entre des phases de réplication virale intenses (phases lytiques) et des phases où l'expression virale est quasi-silencieuse (phase de latence). Les phases lytiques assurent ainsi la production et la diffusion du virus vers de nouveaux hôtes, alors que la phase de latence, peu immunogène, assure la persistance à long terme du virus dans l'organisme (Kukhanova, Korovina, and Kochetkov 2014). Cette alternance de phase de latence et de réactivation est contrôlée par l'immunité chez l'individu immunocompétent sans pour autant permettre

l'éradication totale du virus. La pathogénicité des HHV est particulièrement marquée dans les situations d'immunodépressions (comme les patients sous immunosuppresseurs, co-infection VIH, maladies génétiques…), illustrant le rôle essentiel du contrôle des infections aux HHV par l'immunité.

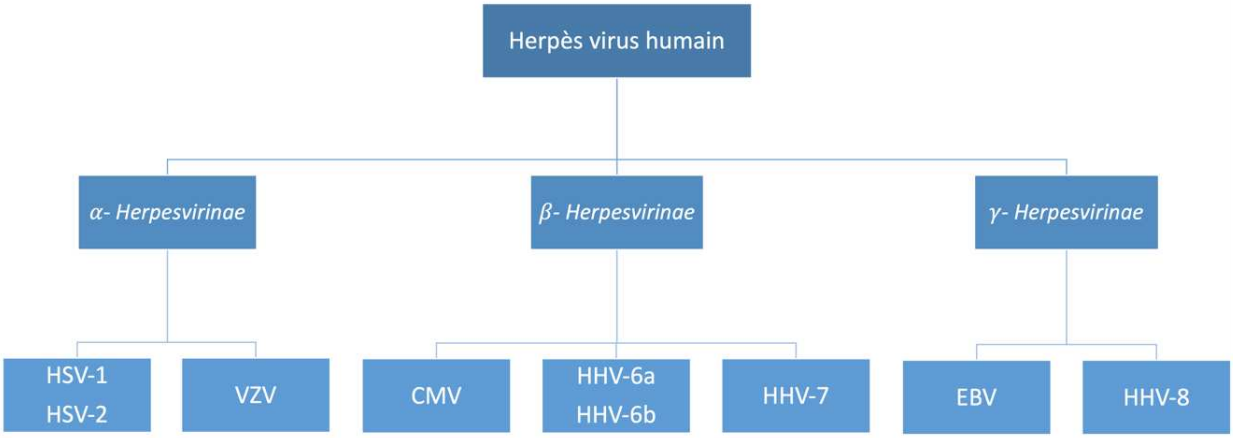


Figure 11 : Classification des Herpesvirus humains en sous-famille.
Cette figure présente la classification des 8 HHV appartenant à la famille des Herpesviridae, répartis en trois sous-familles : Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae et Gammaherpesvirinae. Les virus de la sous-famille Alphaherpesvirinae (HSV-1, HSV-2, et VZV) se caractérisent par leur capacité à établir des infections latentes dans les neurones et une réactivation rapide. Les Betaherpesvirinae (CMV, HHV-6, HHV-7) ont une phase de réplication plus lente et infectent principalement les cellules épithéliales et immunitaires, avec une latence dans les cellules myéloïdes. Enfin, les Gammaherpesvirinae (EBV, HHV-8) sont principalement associés aux cellules lymphoïdes et peuvent être impliqués dans le développement de certaines tumeurs. Cette classification repose sur des différences dans les tropismes cellulaires, la latence et le cycle de réplication des virus. Les données sont adaptées de l'étude de (Slots and Slots 2019).

Chez l'Homme, huit types de HHV différents ont été identifiés et ont été répartis en trois sous-familles (Figure 11). Ces virus infectent un grand nombre de personnes, avec une primo-infection qui survient généralement tôt au cours de l'enfance. Les infections par les HHV sont des infections persistantes et caractérisées par des phases de réactivations virales épisodiques. Toutefois, ces infections diffèrent fortement les unes des autres par le type de cellules infectées et par les pathologies associées à ces infections (Tableau 1). On distingue généralement des pathologies exprimées au cours de la phase de primo-infection ; par exemple, le virus Epstein-Barr (EBV) peut provoquer chez le jeune adulte la mononucléose infectieuse, alors que les phases tardives de l'infection chez l'individu immunisé peuvent être associées à des cancers ou des désordres auto-immuns. Le tableau 1 résume quelques-uns

de ces éléments.

Tableau 1 : Caractéristiques des 8 Herpesvirus humain

Ce tableau résume les principales caractéristiques des 8 HHV en présentant pour chacun leur prévalence en Europe, les cellules cibles principales, leurs manifestations cliniques les plus courantes et le site où ces virus établissent une latence. Les données sont issues de l'analyse présentée par ("Herpes Virus Humains :: Microorganismes :: ePOPI," n.d.).

Nom	**Prévalence**	**Cellule cible principale**	**Principales manifestations**	**Site de latence**
HHV-1 Herpes virus simplex 1 (HSV-1)	70%	Cellules épithéliales	Lésions buccales et génitales, érythème polymorphe, encéphalite	Neurones
HHV-2 Herpes virus simplex 2 (HSV-2)	15-20%		Lésions génitales, rarement buccales	
HHV-3 Virus Varicelle-Zona (VZV)	95%		Varicelle et zona	
HHV-4 Epstein Barr virus (EBV)		Lymphocytes B et cellules épithéliales	Mononucléose infectieuse, lymphomes et carcinomes, Sclérose en plaques	Lymphocytes B
HHV-5 Cytomégalovirus (CMV)	> 50%	Monocytes et cellules épithéliales	Syndrome mononucléosique	Monocytes
HHV-6A et HVV-6B	90%	Lymphocytes, monocytes, macrophages et cellules épithéliales	Roséole infantile	Lymphocytes T
HHV-7				
HHV-8	< 20%	Lymphocytes	Sarcome de Kaposi,	Lymphocytes

			lymphome primitif des séreuses, certains types de maladie de Castleman multicentrique	B

1. Présence des HHV dans la cavité orale

Les HHV sont fréquemment présents dans la cavité buccale, et sont notamment détectés dans la salive. En fonction de leurs caractéristiques spécifiques, ces virus sont capables de se répliquer dans presque tous les tissus oraux et sont détectés dans les muqueuses orales, les tissus lymphoïdes, les ganglions neuronaux, les structures glandulaires ainsi que dans l'endothélium oral. Cette réplication dans les différents sites oraux explique en grande partie la charge virale détectée dans la salive (Slots 2015). La cavité orale est ainsi souvent considérée comme un réservoir de diffusion systémique dans l'organisme de ces virus, pouvant jouer un rôle direct dans la pathogénèse des maladies systémiques.

En pathologie orale, plusieurs membres des HHV sont impliqués, dont les plus courants sont le virus de l'Herpès virus simplex de type 1 (HSV-1), l'Epstein-Barr virus (EBV), le cytomégalovirus (CMV) et le virus Varicelle-Zona (VZV) dans une moindre mesure. Ils provoquent des maladies inflammatoires aigües, localisées ou généralisées, ainsi que dans certains cas, des cancers. Les phases lytiques de ces virus sont plutôt associées à des inflammations et des ulcérations des tissus infectés, tandis que les phases de latence peuvent être liées à des mécanismes oncogénétiques (Rickinson 2014).

Après une primo-infection à HSV-1, souvent accompagnée de gingivostomatite chez les jeunes enfants, le virus devient latent dans les ganglions nerveux et peut se réactiver sous l'effet de facteurs déclenchants comme le stress, la fatigue ou une baisse du système immunitaire déclenchant l'infection la plus courante caractérisée par des vésicules douloureuses sur les lèvres ou autour de la bouche (Herpès labial ou boutons de fièvre). EBV est responsable en primo-infection de la mononucléose infectieuse qui peut se manifester par des maux de gorge intenses, des gonflements des ganglions et parfois des lésions dans la cavité buccale. L'infection EBV est également responsable de la leucoplasie chevelue orale observée notamment dans les situations d'immunodépressions. De plus, certains cancers oraux comme le lymphome de Burkitt et le carcinome du nasopharynx sont également associés à EBV (Y.-P. Chen et al. 2019), (Shannon-Lowe, Rickinson, and Bell 2017), (Oksenhendler, Boutboul, and Galicier 2019). Le CMV, quant à lui, provoque rarement des lésions orales chez les personnes immunocompétentes, mais peut causer des ulcérations chroniques et douloureuses dans la bouche et sur les gencives chez les immunodéprimés. La réactivation VZV peut se manifester sous forme de

zona oral, avec des vésicules douloureuses affectant les gencives, la langue, ou d'autres parties de la cavité buccale. Les manifestations cliniques de ces infections sont souvent caractérisées par des poussées évolutives récurrentes, un schéma similaire aux inflammations parodontales, suggérant des mécanismes inflammatoires partagés.

2. Implication des HHV dans les maladies parodontales

Bien que la dysbiose bactérienne gingivale soit un facteur clé dans la progression des pathologies orales, les limites évoquées suggèrent l'implication possibles d'autres facteurs étiologiques. En effet, le modèle traditionnel d'une étiologie purement bactérienne dans les pathologies parodontales présente plusieurs limites qui remettent en question son exhaustivité. Tout d'abord, aucun agent bactérien spécifique n'a été clairement identifié comme seul responsable pour déclencher la maladie, ce qui suggère que d'autres facteurs peuvent également être impliqués. Ensuite, les approches antibactériennes, telles que l'assainissement, la désinfection ou l'utilisation d'antibiotiques, montrent des résultats mitigés et parfois controversés, remettant en cause leur efficacité systématique. De plus, il existe un décalage entre les phases de réactivation clinique et les évolutions du biofilm bactérien. En effet, des récidives cliniques de la maladie surviennent parfois sans présence de plaque bactérienne, suggérant que d'autres mécanismes pourraient être en jeu. Par ailleurs, les premières étapes du processus inflammatoire parodontal semblent précéder le développement de la dysbiose du biofilm. Cela soulève la question du rôle potentiel des facteurs inflammatoires non bactériens dans le déclenchement et la progression de la maladie, comme l'ont suggéré des études récentes (Van Dyke, Bartold, and Reynolds 2020).

Dans les années 1990, il a été démontré que les lésions parodontales étaient souvent co-infectées par des HHV. Le Professeur Jørgen Slots a proposé l'hypothèse d'une contribution virale dans l'étiopathogénèse de la parodontite et ont conduit à proposer dès 1996, un nouveau paradigme pour expliquer les interactions entre les virus et les bactéries dans le cadre des maladies parodontales, qu'il a désigné sous le terme de « synergie viro-bactérienne » (Contreras and Slots 2000). Ce concept met en avant l'idée que l'infection combinée par des virus et des bactéries dans la cavité orale pourrait favoriser un environnement propice au développement des maladies parodontales. Slots suggère que les virus affaiblissent les défenses immunitaires locales, facilitant ainsi la prolifération bactérienne, tandis que les bactéries stimulent la réactivation des virus latents. En modulant la réponse immunitaire de l'hôte, ces virus provoquent une immunosuppression temporaire ou une inflammation locale accrue, aggravant les dommages tissulaires et accélère la destruction des tissus parodontaux (Slots 2007).

Trois HHV ont démontré leur capacité à infecter les tissus parodontaux, à savoir EBV, CMV et HSV-

1, leur présence étant corrélée à la progression des maladies parodontales, à leur sévérité et à la profondeur des poches parodontales (Slots and Slots 2019), (Kato et al. 2015). Une étude a démontré que les sites parodontaux atteints présentaient des quantités significativement plus élevées de HHV comparativement aux sites parodontaux sains (Dawson et al. 2009). Ces résultats ont été renforcés par une revue de la littérature publiée en 2019, dans laquelle Jørgen Slots a compilé plusieurs études internationales afin de résumer la prévalence moyenne de ces trois virus dans les tissus gingivaux sains et lésionnels selon la sévérité de la maladie parodontale (Tableau 2) (Slots and Slots 2019).

Tableau 2 : Fréquence des infections à EBV, CMV et HSV-1 dans les différents stades de la parodontite.

Ce tableau présente la prévalence des infections par trois HHV (CMV, EBV et HSV-1) selon l'état parodontal : parodonte sain, parodontite chronique ou parodontite agressive. Les données issues de cette méta-analyse illustrent une association significative entre la présence de ces virus et la sévérité de la maladie parodontale, renforçant l'hypothèse d'une contribution virale dans la progression des pathologies parodontales (Slots and Slots 2019).

Statut parodontal	**CMV**	**EBV**	**HSV-1**
Parodontite agressive	46%	52%	71%
Parodontite chronique	46%	39%	36%
Parodonte sain	6%	8%	6%

Chapitre 2 : Infection du ligament parodontal par HSV-1 ; Première mise en évidence

I. Introduction

La littérature scientifique rapporte la présence fréquente des HHV dans les lésions parodontales, notamment EBV, HSV-1 et CMV. La détection de ces virus dans les poches parodontales lors de parodontite est généralement associée à une augmentation de leur charge virale et cela, proportionnellement à la sévérité de la maladie (Slots and Slots 2019) (Olivieri et al. 2020). Ces observations suggèrent que ces infections virales opportunistes exploitent l'environnement inflammatoire associé à la dysbiose bactérienne du biofilm parodontal.

A ce jour, encore peu de données mécanistiques et physiopathologiques documentent le rôle des HHV dans les tissus gingivaux et parodontaux. Notre projet vise à combler cette lacune en fournissant des informations nouvelles sur ces aspects. En particulier, nous avons cherché à identifier les cibles cellulaires parodontales des HHV au cours de la parodontite. Les travaux antérieurs de notre laboratoire concernent en particulier EBV, un virus typiquement oral et très fréquemment détecté dans la cavité orale, dans la salive, les amygdales et les muqueuses orales. Au cours de ces travaux, nous avons pu établir qu'EBV est détecté dans les épithéliums parodontaux, notamment dans les cellules de l'épithélium jonctionnel (Figure 12C), un épithélium qui attache la gencive à la dent et qui participe à protéger les tissus sous-gingivaux des invasions microbiennes (Vincent-Bugnas et al. 2013) (Tonoyan et al. 2024). De plus, un grand nombre de plasmocytes de l'infiltrat parodontal apparaissent également infectés par EBV (Olivieri et al. 2020). Ces travaux permettent de documenter les sites cellulaires potentiellement infectés par EBV au cours de la parodontite, typiquement les cellules épithéliales du parodonte et les plasmocytes infiltrés. De plus, une analyse transcriptomique du contenu des poches parodontales a permis de démontrer que la présence d'EBV dans les lésions parodontales était corrélée à une surexpression de nombreux gènes pro-inflammatoires et de marqueurs plasmocytaires, ainsi qu'à une diminution de marqueurs épithéliaux (Tonoyan et al. 2024, en révision). Ces données moléculaires corroborent les observations histologiques suggérant une atteinte lytique des épithéliums par EBV ainsi qu'une exacerbation inflammatoire médiée potentiellement par des lymphocytes B différenciés en plasmocytes.

Par ailleurs, ces mêmes travaux établissent qu'EBV est également présent, en quantité similaire, dans les lysats tissulaires de gencives saines et non-inflammatoires (Tonoyan et al. 2024). Toutefois, dans cette situation, l'analyse transcriptomique ne met pas en évidence de gènes inflammatoires ou épithéliaux qui soient différentiellement exprimés en présence du virus, seuls des gènes types de la réponse antivirale (interférons) sont stimulés par la présence du virus. Ces données suggèrent donc un modèle où il existerait une situation d'équilibre, ou de tolérance immunitaire, entre l'hôte et EBV dans une muqueuse « saine », cet équilibre étant perdu dans la situation inflammatoire de la parodontite.

Ces résultats suggèrent donc une implication directe de EBV en pathogénèse parodontale, dans le contexte d'une synergie viro-bactérienne (Tonoyan et al. 2019).

Ayant accumulées ces premières données concernant EBV, nous avons débuté une nouvelle thématique de recherche concernant HSV-1, un autre HHV fréquemment détecté dans les lésions parodontales. En effet, à notre connaissance, aucune donnée virologique n'est actuellement disponible concernant l'infection des compartiments tissulaires parodontaux par HSV-1. L'exploration de cette question a donc constitué un axe central de mon travail doctoral, avec pour objectif de mieux comprendre les interactions entre le virus HSV-1 et le tissu parodontal.

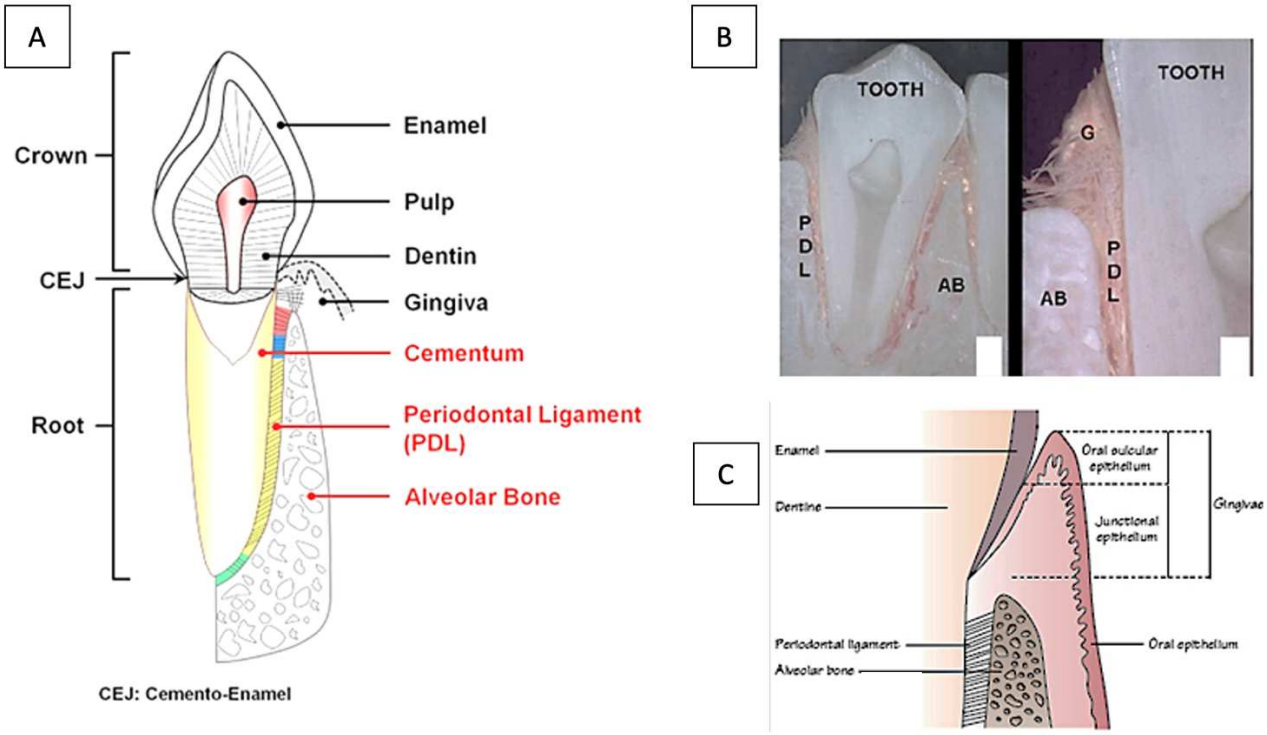


Figure 12 : Structure et organisation des tissus parodontaux.

(A) Schéma illustrant le complexe tissulaire parodontal, incluant la structure des différents tissus parodontaux. (B) Coupe longitudinale de la dent montrant l'attachement dentaire aux structures environnantes : ligament parodontal (PDL), l'os alvéolaire (AB), la gencive (G), l'artère alvéolaire inférieure (AAI), les canaux de Volkmann (VC). (C) Présentation des principaux épithéliums parodontaux. Adaptée de (Park et al. 2016)

II. Première mise en évidence de l'infection des cellules du ligament parodontal par HSV-1

HSV-1 est un virus fréquemment détecté dans la cavité orale (Thier et al. 2017), ce virus présente un tropisme pour les cellules nerveuses, dans lesquelles il réside principalement à l'état latent, et dans les tissus épithélio-conjonctifs, qu'il infecte efficacement de manière lytique provoquant une réaction inflammatoire aigüe et locale, comme observée au niveau labial. L'objectif de cette étude était de mettre en évidence la capacité de HSV-1 à infecter le ligament parodontal, un tissu conjonctif essentiel qui assure l'attachement des dents à l'os alvéolaire et joue un rôle crucial dans la santé bucco-dentaire. Ces travaux ont conduit à la publication de l'article scientifique "Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Human Periodontal Ligament" dans le Journal *International Journal of Molecular Science* (IJMS) le 2 août 2024. Mon travail s'est concentré principalement sur l'infection des cellules et des fragments *ex vivo* du ligament parodontal par HSV-1, ainsi que sur l'analyse des expressions des gènes viraux et des gènes impliqués dans les réponses immunitaires de l'hôte.

Le ligament parodontal (PDL) est un tissu conjonctif mince (environ 1 mm), riche en fibres collagéniques, et fortement vascularisé et innervé. Il est majoritairement composé de cellules mésenchymateuses de type fibroblastique, mais il contient également une grande diversité d'autres types cellulaires, dont des cellules épithéliales, immunitaires, des cémentoblastes, des ostéoblastes, ainsi que des cellules souches mésenchymateuses (Figure 1 de l'article) (de Jong et al. 2017). Ce tissu joue un rôle fondamental dans le maintien des dents au sein de la matrice osseuse, il participe au remodelage et à la régénération des tissus dentaires, ainsi qu'à la régulation de l'immunité parodontale. La maladie parodontale s'accompagne de la destruction du PDL. La perte de ce tissu ligamentaire est considérée comme un évènement majeur au cours de l'évolution de la parodontite associée à l'approfondissement de la poche parodontale et sans doute à l'irréversibilité de la maladie. Compte tenu de sa nature conjonctive et de son importance dans l'intégrité du parodonte, nous avons émis l'hypothèse que le PDL pourrait être une cible probable pour l'infection par HSV-1.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle très reproductible de cultures primaires de cellules dérivées de ligaments parodontaux humains, modèle mis en place par le Professeur Robert Marsault (modèle PDL-cells dans l'article). Ce modèle, contient notamment des cellules souches mésenchymateuses et il conserve une capacité de différenciation en chondrocytes, cellules osseuses et adipocytes. L'infection expérimentale des cellules du PDL par HSV-1 a permis de démontrer la forte permissivité de ces cellules vis-à-vis de l'infection par HSV-1 (Figure 1 de l'article). En comparaison avec les cellules VERO, un modèle traditionnel d'infection par HSV-1, les cellules du PDL présentent des niveaux de productions virales similaires, voire supérieurs.

Dans cette étude, les cellules du PDL ont été exposés à HSV-1 dans différentes conditions expérimentales. Nous avons utilisé des techniques telles que la cytométrie en flux pour caractériser les cellules, l'immunofluorescence pour localiser le virus, et la PCR en temps réel pour mesurer la charge virale et l'expression génique des réponses immunitaires. Nos résultats montrent que HSV-1 infecte efficacement les cellules du PDL, avec une expression rapide (1h) des protéines très précoces dans le noyau et une augmentation progressive de la charge virale. L'infection est lytique et provoque la mort cellulaire (Figure 2 de l'article). L'infection par HSV-1 induit des effets cytopathiques significatifs, notamment une altération de la morphologie cellulaire, un gonflement des cellules et leur mort par apoptose. Ces effets délétères augmentent avec la concentration virale et la durée d'exposition, perturbant la régénération cellulaire et l'intégrité du ligament.

Par ailleurs, nous avons également testé la permissivité des fragments tissulaires de ligaments parodontaux *ex vivo*, vis-à-vis de HSV-1. Ces PDL étaient issus de donneurs sains et collectés chirurgicalement après extraction de dents de sagesse. L'infection de ces fragments a été confirmée par l'analyse de l'expression des gènes viraux ICP0, ICP4 et ICP8, à différents temps d'exposition et concentrations virales, montrant des variations d'intensités d'infection selon les donneurs (Figure 2 de l'article).

En réponse à l'infection, on observe une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-6, et le TNF-α, contribuant à l'inflammation et à la dégradation des tissus parodontaux. Une réponse antivirale innée, caractérisée par une augmentation des interférons (IFN alpha, beta et lambda), a également été détectée. De plus, une synergie entre les réponses immunitaires des IFN et de l'IL-1β a été mise en évidence lors de la combinaison de l'infection par HSV-1 et de l'ajout de peptidoglycane, suggérant une synergie des effets inflammatoires induits par les produits dérivés bactériens et l'infection virale dans l'inflammation parodontale (Figure 3 de l'article).

Ce travail met pour la première fois en évidence que le PDL pourrait constituer une cible d'infection potentielle pour une infection virale telle que HSV-1 dans la cavité buccale. Notre étude suggère que l'interaction entre HSV-1 et le PDL pourrait exacerber les maladies parodontales. De plus, bien que les infections bactériennes soient souvent considérées comme la principale étiologie des altérations du PDL, notre travail démontre que la synergie entre HSV-1 et les bactéries pourrait intensifier l'inflammation et la dégradation des tissus parodontaux. Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques, suggérant que cibler les infections virales pourrait constituer une stratégie prometteuse pour traiter ou prévenir les maladies parodontales chroniques et ainsi améliorer la santé bucco-dentaire globale.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Human Periodontal Ligament

Morgane Ortis [1,†], Marlène Chevalier [1,†,‡], Charles-Vivien Olivieri [1], Sébastien Vitale [2], Adrien Paul [1,§], Lilit Tonoyan [1], Alain Doglio [1,3,*] and Robert Marsault [1]

[1] Laboratoire MICORALIS, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Côte d'Azur, 5, Rue du 22ème BCA, 06300 Nice, France; morgane.ortis@univ-cotedazur.fr (M.O.); marlene.chevalier@univ-cotedazur.fr (M.C.); charlesolivieri@sfr.fr (C.-V.O.); dradrienpaul@gmail.com (A.P.); lilit.tonoyan@univ-cotedazur.fr (L.T.); robert.marsault@univ-cotedazur.fr (R.M.)
[2] Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, 06003 Nice, France; vitale.s@chu-nice.fr
[3] Unité de Thérapie Cellulaire et Génique (UTCG), Centre Hospitalier Universitaire de Nice, 06003 Nice, France
* Correspondence: alain.doglio@univ-cotedazur.fr
† These authors contributed equally to this work.
‡ Present address: Ecoseas, Université Côte d'Azur, 06000 Nice, France.
§ Present address: Centre Dentaire, 466 Avenue Saint Basile, 06250 Mougins, France.

Abstract: The periodontal ligament (PDL) is a complex connective tissue that connects the tooth root to the dental alveolar bone and plays crucial mechanical roles. PDL also exhibits regenerative roles and regulatory functions to maintain periodontium integrity and homeostasis. While PDL exposure to oral microbial pathogens is common, virtually nothing is known regarding viral infections of PDL. In particular, human herpes simplex virus type 1 (HSV-1) persistently infects the oral cavity through infections of the oral epithelium, connective tissue and neurons. While the oral spread of HSV-1 is generally asymptomatic, this virus has also been implicated in various oral pathologies. In this study, using a primary cell model derived from PDL (PDL cells), and whole surgical fragments of PDL, we provide evidence supporting the efficient infection of PDL by HSV-1 and the promotion of cytopathic effects. Infection of PDL by HSV-1 was also associated with an acute innate inflammatory response, as illustrated by the production of antiviral interferons and pro-inflammatory cytokines. Furthermore, this inflammatory response to HSV-1 was exacerbated in the presence of bacterial-derived products, such as peptidoglycans. This work therefore highlights the ability of HSV-1 to infect mesenchymal cells from PDL, suggesting that PDL may serve as a viral reservoir for the periodontal spread of HSV-1. Moreover, this raises questions about HSV-1 oral pathogenesis, as HSV-1-associated cytopathic and inflammatory effects may contribute to profound alterations of PDL integrity and functioning.

Keywords: periodontal ligament; viral infection; HSV-1; immune response; periodontal inflammation; oral diseases

check for updates

Citation: Ortis, M.; Chevalier, M.; Olivieri, C.-V.; Vitale, S.; Paul, A.; Tonoyan, L.; Doglio, A.; Marsault, R. Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Human Periodontal Ligament. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8466. https://doi.org/10.3390/ijms25158466

Academic Editor: Shun-Fa Yang

Received: 15 June 2024
Revised: 26 July 2024
Accepted: 31 July 2024
Published: 2 August 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The periodontal ligament (PDL) is a unique thin connective tissue that covers the root of the tooth between the dental alveolar bone and the tooth cementum. The immediate function of the PDL is to attach the tooth to the alveolar bone through a dense network of fibers that allow withstanding the forces of mastication. This ligament tissue has a complex cellular content, made up of fibroblast-like cells, osteoblasts, osteoclasts, epithelial cell rests of Malassez, cementoblasts and odontoclasts, and exhibits highly structured microstructures, such as networks of blood vessels and sensory nerve endings [1–3]. In addition, PDL also contains mesenchymal stem cells (MSCs) able to differentiate into osteoblasts, cementoblasts and fibroblasts, allowing for periodontium regeneration and tissue repair [4,5]. Beyond its mechanical and regenerative roles, PDL also exhibits immune regulatory functions, eliciting a regulatory immune response to face acute inflammation triggered by

periodontal pathogens [6–9]. Particularly, PDL cells have been shown to produce various cytokines and chemokines in response to different inflammatory stimuli, indicating that PDL cells are fibroblast-like cells able to act as immune cells [10].

While the oral cavity harbors a wide variety of pathogenic viruses, virtually nothing is known about the interplay between PDL and viral infections. Nevertheless, PDL exhibits distinct features that may facilitate viral infections, such as its cellular diversity and a vascular network intimately connected to tissue structures. Particularly, the human herpes simplex virus type-1 (HSV-1) is a common oral virus widely distributed in the human population [11]. Over 70% of the population shed HSV-1 asymptomatically in the oral cavity at least once a month, with many individuals appearing to shed oral HSV-1 more than 6 times per month [12]. Oral HSV-1 shedding can eventually result in a mild disease, such as herpes labialis, the vesicular lesions on or near the lips that are commonly known as cold sores [13]. HSV-1 is also capable of causing much more serious illnesses, including herpes stromal keratitis, herpes encephalitis and disseminated neonatal infections [14,15]. Recent evidence also suggests a potential contribution of HSV-1 to Alzheimer's disease [16].

Over the past decade, several studies have highlighted the likely role of various human herpesviruses (HHVs), including Epstein–Barr virus (EBV), cytomegalovirus and HSV-1, in the pathogenesis of periodontitis [17,18]. Recent meta-analysis and examination survey based on large cohorts of patients revealed that HSV-1 was significantly associated with periodontitis, and notably with severe periodontitis [19,20]. While infections of epithelial cells and plasma cells have been proposed to support EBV spread in periodontal lesions [21–23] the mechanisms supporting HSV-1 periodontal pathogenesis are still elusive. It is well established that HSV-1 primarily exhibits tropism for epithelial cells and fibroblasts, and infects skin and connective dermal tissues. Subsequently, it infects the termini of neurons and travels in a retrograde manner to the neuronal cell body, where it remains in a latent state until reactivated by different stimuli [24,25]. Here, we explore the hypothesis that HSV-1 may infect mesenchymal cells originating from PDL, examining the possibility that the PDL may serve as a target tissue capable of sustaining HSV-1 infection in the periodontium.

2. Results

2.1. Implementation of a PDL-Cell Model

Single-cell suspensions of PDL (n = 6) were extemporaneously characterized by flow cytometry. Overall, before seeding, FACS-analysis of single-cell suspensions of PDL revealed similar cell viability across donors (80% ± 4.8). However, there was notable variability in the frequencies of different cell populations, reflecting the inherent differences in the initial single-cell preparations from the crude tissue samples (n = 6). The PDL hematopoietic cell content (CD45) was 36.6% ± 19.1 and the mesenchymal cell content (CD29 and CD105) was 24.2% ± 18 (Figure 1A). Apart from hematopoietic and mesenchymal cells, PDL single-cell suspensions also contained other cell types ($CD45^{neg}$ $CD29^{neg}$ $CD105^{neg}$) at 36.7% ± 23.4, which were not further characterized in this study. After the seeding of PDL single-cell suspensions in cell culture flasks, the phenotype of PDL cells was monitored from early (P1) to late cell passages (P7) (in a total of n = 19 samples from 4 different PDLs). The analysis revealed a highly homogeneous and stable mesenchymal cell phenotype, which was present very early after seeding (P1), predominantly comprised of cells expressing both CD29 and CD105 (98.1% ± 1.2). Of note (Figure 1B), CD105 exhibited a wide range of intensities in PDL cells before seeding, but after seeding, its expression became very uniform. In contrast, no major change was observed regarding CD29 expression in PDL cells before and after seeding. As illustrated in Figure 1C, cultured PDL cells exhibited mostly typical fibroblast-like shapes. In addition, PDL cells cultured in specific cell differentiation media were able to differentiate into osteogenic cells, adipocytes and chondrocytes (Figure 1D), confirming the presence of pluripotent MSCs in cultured PDL cells and their ability to differentiate in vitro. Each batch of PDL cells was maintained in culture over seven passages without a loss of growth capacity.

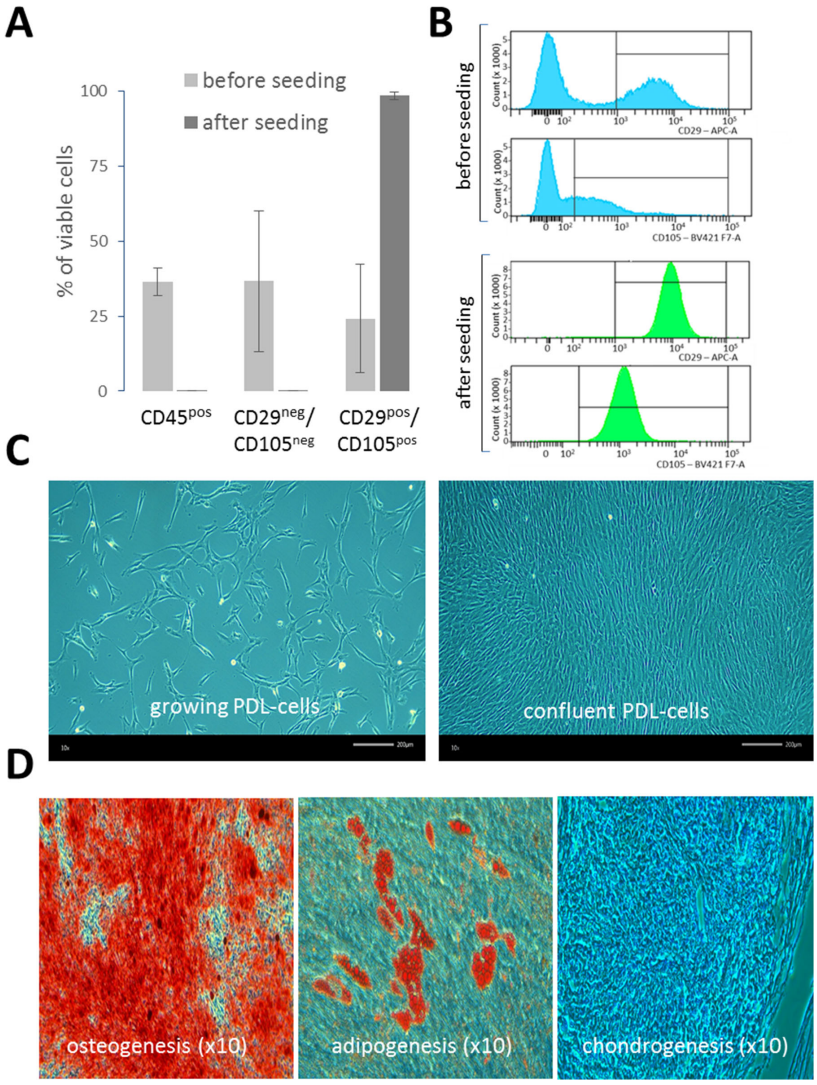


Figure 1. Characterization of PDL cells. (**A**) FACS analysis of PDL single-cell suspensions and PDL cells in cultures. Hematopoietic cells were identified by CD45, and mesenchymal cells by CD29 and CD105 in the $CD45^{negative}$ population. PDLs from 6 donors before seeding and cultured cells from 4 PDLs at passages P1 to P7 (19 samples total) after seeding were analyzed. Bars represent the mean % of viable cell populations with standard deviation. (**B**) Representative FACS histograms showing CD105 and CD29 expression in $CD45^{negative}$ PDL cell populations before (blue) and after (green) seeding. (**C**) Fibroblast-like morphology of growing and confluent primary PDL cells culture. (**D**) Osteogenic (**left**), adipogenic (**center**) and chondrogenic (**right**) differentiation potential of PDL cells. Images (×10) show calcium deposition and mineralization in osteocytes (alizarin red S staining), intracellular lipid droplets in adipocytes (oil red O staining) and micromass culture of chondrocytes (alcian blue staining).

2.2. HSV-1 Infection of PDL-Cells

To determine whether PDL cells were permissive to HSV-1 infection, we performed in vitro infection studies on cultured PDL cells and PDL fragments (Figure 2). Infection of

cultured PDL cells induced marked morphological changes, which were observed 24 and 48 h after the viral challenge (Figure 2A). These morphological changes, characterized by ballooning and subsequent detachment of the dead cells, highlighted the cytolytic activity of the virus in PDL cells.

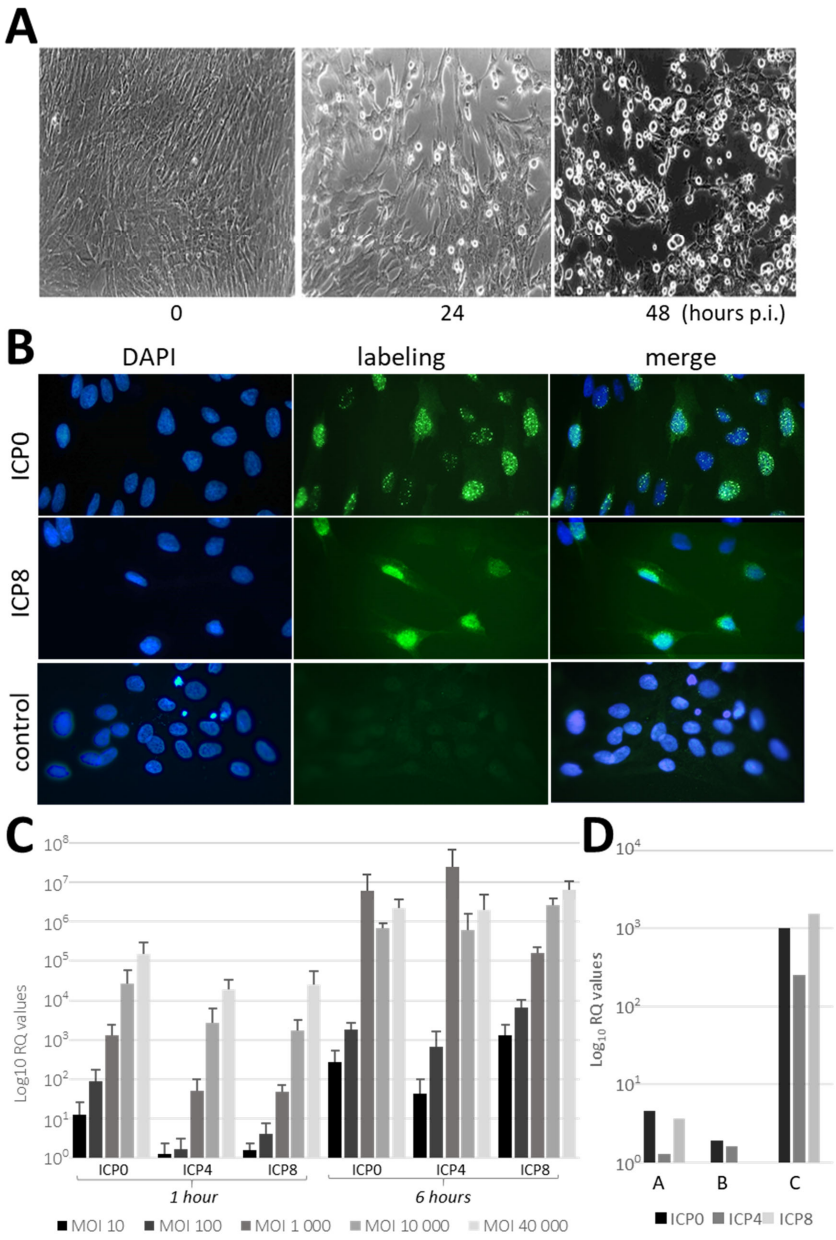


Figure 2. HSV-1 infection of PDL cells. (**A**) Morphological changes in PDL cells 24 and 48 h post-infection (p.i.) with HSV-1 (MOI 100), showing ballooning and detachment of dead cells (10× magnification). (**B**) Visualization of HSV-1 infection in PDL cells by immunofluorescent staining (green) of immediate-early (ICP0) and early (ICP8) viral proteins (10× magnification). Cells were

infected with HSV-1 (MOI 100), fixed at 1 h p.i. (ICP0) and 24 h p.i. (ICP8). Control: irrelevant mouse IgG1; nuclei stained with DAPI (blue). Panels (**A**,**B**) are representative of 6 independent infections. (**C**) RT-qPCR of PDL cells infected with HSV-1 at various MOIs (10 to 40,000), measuring immediate-early (ICP0, ICP4) and early (ICP8) transcripts at 1 and 6 h p.i. Bars show mean expression values; error bars indicate standard deviations (n = 3). Viral titer-dependent (MOI) response to HSV-1 infection in PDL cells was determined using repeated measures ANOVA. The statistical significance and P-values of the comparisons are presented in Table S1 to avoid overcrowding the graph. (**D**) RT-qPCR of PDL fragments exposed to HSV-1 (4×10^7 TCID50/mL) for 4 h, showing Log_{10} fold changes in ICP0, ICP4 and ICP8 transcripts from 3 donors (PDLs A, B and C). Baseline in (**C**) from mock-infected cells; in (**D**) from uninfected fragments of the same donors. Gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and normalized to GAPDH as a reference gene.

The effectiveness of HSV-1 infection of PDL cells was demonstrated through the detection of the immediate (ICP0) and the early (ICP8) viral proteins by immunofluorescent staining (IF; Figure 2B). ICP0 was detected in cell nuclei within 1 h post-infection (p.i.) and ICP8 was abundantly accumulated in cell nuclei a few hours later (24 h). These results showed that there was no delay in the onset of HSV-1 infection in PDL cells. HSV-1 infection was also confirmed by RT-qPCR experiments to monitor viral gene expression in PDL. ICP0, ICP4 and ICP8 viral transcripts were expressed soon after infection of cultured PDL cells (1 h p.i.), reaching high levels of expression at 6 h depending on the viral titer (Figure 2C). This highlights the dynamic nature of HSV-1 infection in PDL cells. Higher MOIs resulted in a more rapid expression of the immediate-early gene ICP0 by 1 h p.i. compared to lower MOIs, while ICP4 and the early gene ICP8 peaked more prominently at 6 h p.i. By 6 h p.i., there was a comparable expression among ICP0, ICP4 and ICP8, and from an MOI of 10,000 onwards, differences between higher MOIs diminished. These findings illustrate a dose-dependent effect of HSV-1 infection on viral gene expression kinetics in PDL cells, with higher MOIs leading to earlier and more pronounced expression of immediate-early genes and a shift towards more balanced expression levels of early genes at later time points.

We then investigated the permissiveness of whole fragments of PDL tissues to HSV-1. PDL fragments (n = 3, from donors designated A, B and C) were placed in a medium containing cell-free virus for 4 h, and HSV-1 infection was monitored by the expression of viral transcripts (Figure 2D). An increase in ICP0, ICP4 and ICP8 expression was observed in PDL fragments following HSV-1 exposure. However, the levels of viral infection differed significantly between donors, with pronounced infection observed in PDL fragments from donor C and significant, but much lower, infection in PDL fragments from donors A and B.

2.3. Innate Antiviral Response in HSV-1 Infected PDL Exposed to Bacterial Products

The expressions of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, TNF-α) and markers of the innate antiviral response (IFN-α, IFN-β and IFN-λ) were investigated by RT-qPCR in PDL cells infected with HSV-1 (MOI 100, 24 h) and exposed to bacterial-derived products, such as peptidoglycan (PEG; Figure 3A). The basal levels of IL-1β and TNF-α exhibited a significant increase (9.5- and 43-fold increase, respectively), indicating efficient induction of pro-inflammatory response in PDL cells upon HSV-1 infection. Viral infection was also associated with a marked increase in the antiviral innate response, evidenced by about a 10-fold increase in IFN-α, IFN-β and IFN-λ expression. Conversely, PEG, tested at concentrations of 1 and 10 μg/mL, exhibited a slightly weaker effect on cytokines and IFN response compared to HSV-1. Notably, TNF-α weakly responded to PEG. However, the combination of PEG and HSV-1 infection resulted in a remarkable synergistic effect, significantly boosting the induction of the innate immune response. As indicated in Figure 3A, the ratio between the effect of the HSV-1 and PEG combination and the sum of their individual contribution showed a marked synergistic upregulation of IFN-α, IFN-β, IFN-λ and IL-1β expression. In contrast, no or very low synergism was observed for TNF-α, its stimulation was mainly attributed to the virus.

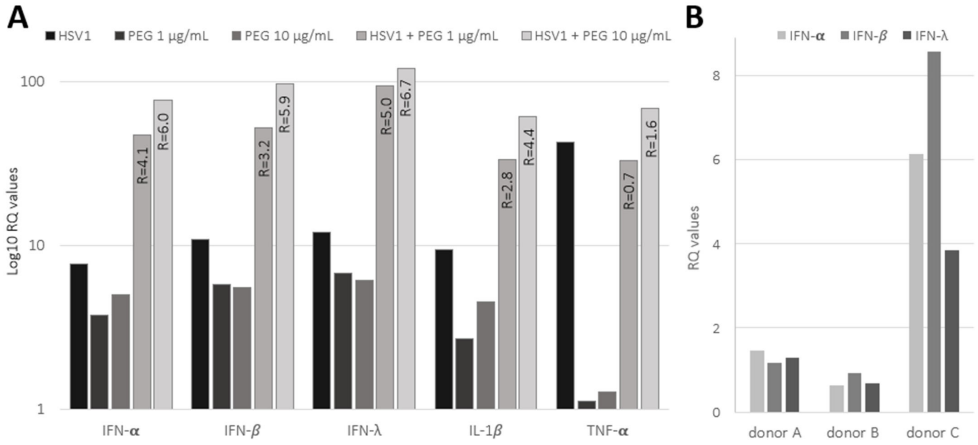


Figure 3. Innate immune response in HSV-1-infected PDL exposed to bacterial peptidoglycan (PEG). (**A**) Expression of interferons (IFN-α, IFN-β, IFN-λ) and cytokines (IL1-β, TNF-α) in cultured PDL cells after 24 h of HSV-1 (MOI 100) exposure with or without PEG. Bars show Log_{10} fold changes in gene expression. The synergy between PEG and HSV-1 was assessed by calculating the ratio (R, shown inside the bars) of the sum of Log_{10} RQ values for the combined condition (HSV-1 + PEG) to the sum of individual conditions. R > 1 indicates synergy, R ≈ 1 additive effect, and R < 1 antagonism. (**B**) Expression of interferons (IFN-α, IFN-β, IFN-λ) in PDL fragments from 3 donors (PDLs A, B, C) after 4 h of HSV-1 (4×10^7 TCID50/mL) exposure. Bars represent fold changes in gene expression. (**A**,**B**) Gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, with GAPDH as the reference gene and mock condition as the reference sample.

Moreover, the IFN antiviral response (IFN-α, IFN-β and IFN-λ) was also analyzed in PDL fragments infected with HSV-1 (Figure 3B). The induction of IFNs remained weak at 4 h p.i. in A and B PDLs; however, strong induction was observed in C PDL, which displayed the highest level of viral expression, as shown in Figure 2D. These results suggested that the IFN response was related to the level of viral infection in PDL fragments and that viral spread in the PDL was able to promote a rapid and marked inflammatory response.

3. Discussion

In this study, we established a primary cell culture model representative of mesenchymal PDL cells. Although this culture system oversimplifies the PDL tissue complexity, it provides a reliable and suitable model for HSV-1 infection of PDL considering that, apart from neurons, the main cell tropism of HSV-1 are stromal cells. One of the main advantages of this model is its ability to maintain a homogeneous phenotype of PDL-derived mesenchymal cells over the long term in cell culture while preserving their capacity for differentiation. Indeed, more than 99% of cultured PDL cells met all the required criteria to be identified as mesenchymal cells with a fibroblast phenotype, in particular, plastic adhesion, expression of mesenchymal markers (CD105, CD29, vimentin), lack of hematopoietic markers (CD45) and the ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes [26]. These observations thus clearly established that HSV-1 infects mesenchymal fibroblasts derived from PDL. However, more exhaustive experiments would be needed to determine whether there are minor phenotypic differences within this fibroblast population and whether these subtypes could present differences in sensitivity to HSV-1. Using this system, we brought the first evidence that PDL may support HSV-1 infection. HSV-1 was shown to quickly spread in PDL cell cultures promoting profound morphological changes and cytopathic effects within 24 h. This model proves to be highly effective for supporting HSV-1 infection in vitro, demonstrating the capability to produce large amounts of infectious HSV-1, at levels comparable to or even higher than those produced by Vero cells.

Furthermore, HSV-1 was also able to infect PDL fragments revealing viral permissiveness in the whole tissue. Previous studies have shown that HSV-1 invasion in oral mucosa can be restricted by mechanical barriers [27]; however, we did not observe any restriction and delay regarding HSV-1 infection in cultured PDL cells and PDL fragments, since immediate-early (ICP0 and ICP4) and early viral transcripts (ICP8) were expressed as soon as 1 h after viral exposure. However, we assume that our experiments may have some limitations, considering microlesions caused by scraping and PDL detachment could have favored the viral entry and diffusion into the tissue. In whole tissue, the level of HSV-1 infection greatly varied between samples, which may reflect the differences in tissue organization and cell content among PDL samples collected by dissection from different individuals. Additionally, the presence of different factors may regulate HSV-1 infection, as suggested by previous studies demonstrating that salivary factors can modulate the infection of AG09319 gingival fibroblasts [28].

Overall, while our study benefited from using simplified and reliable in vitro models of PDL, this approach also presents a significant limitation. Although in vitro models offer controlled experimental conditions suitable for mechanistic studies, they lack the complexity of in vivo infections where interactions with immune cells are crucial. The absence of immune cells in our experimental setup restricts our understanding of how HSV-1 interacts with the host immune system during periodontal infections. To address this limitation, future investigations could explore more sophisticated models that better simulate the oral environment. Several potential in vivo models could be considered for studying HSV-1 infection in PDL cells and its interactions within the oral environment. Organotypic culture models of human oral tissues provide a more realistic three-dimensional environment to examine HSV-1 entry, replication and spread. Mouse models provide a controlled setting to explore HSV-1 pathogenesis and immune responses in the oral cavity. Humanized mouse models, involving engrafting mice with human immune cells or tissues, enhance translational relevance by allowing the study of HSV-1 infection in the presence of human immune components. Finally, clinical studies involving HSV-1-infected individuals with periodontal diseases will provide valuable clinical data on viral load, persistence and immune responses directly in affected tissues. Our ongoing research includes one such clinical study to further explore these aspects.

Innate immunity is crucial for an effective host defense against pathogenic microorganisms in periodontal tissues. PDL cells have been shown to synthesize immunomodulatory cytokines that are believed to influence the local response to infections [6–9]. We thus analyzed the innate immune response of the PDL exposed to HSV-1 and concluded that viral infection promoted an acute pro-inflammatory immune response in both cultured PDL cells and PDL fragments with a significant increase in TNF-α and IL-1β and induction of innate antiviral cytokines such as the type I interferons (IFN-α and IFN-β) and type III interferon (IFN-λ). The level of IFN induction in response to HSV-1 appeared lower in HSV-1-infected PDL fragments than in cultured PDL cells. However, this difference may be explained by the duration of viral exposure, which was adjusted to each experimental system (i.e., 4 h versus 24 h, respectively). Moreover, the innate response of PDL cells was shown to be over-stimulated when cells were infected with the virus in the presence of bacterial-derived products such as PEG. Although future studies will be needed to confirm synergistic effects through in-depth quantitative methods, the initial results presented here show that the combination of HSV-1 and PEG strongly enhances the inflammatory response of PDL cells. It has been proposed that the exacerbation of periodontal pathogenesis may involve synergistic interactions between periodontal bacterial dysbiosis and viral infections. Our results thus highlight the possibility that PDL may contribute to acute periodontal inflammation when exposed to different pathogen-associated molecular patterns from both bacteria and viruses.

In conclusion, the present study provides evidence to support that PDL may represent a reservoir for HSV-1 spread not only in the periodontium but also beyond in the oral cavity. HSV-1 shedding is common in the oral cavity, and its abundance in inflamma-

tory periodontal sites has been reported. Furthermore, PDL is densely innervated and vascularized tissue, with HSV-1 infections typically occurring via the neural route and possibly also via the hematogenous route [29]. These factors collectively suggest a high probability of HSV-1 spreading in PDL in vivo, although further investigations are needed for confirmation. However, the presence of HSV-1 in PDL may promote severe immune dysfunction and significant alterations in PDL organization due to its cytopathogenic effect. This assumption opens the door to further investigations into the infection of periodontal tissues by HHVs and highlights the possible need for antiviral therapy. This therapy should be based on the administration of anti-HHV drugs to patients suffering from periodontal diseases, notably periodontitis.

4. Materials and Methods

4.1. Preparation of PDL Fragments and PDL Single-Cell Suspensions

PDLs were collected from healthy individuals undergoing surgery for wisdom teeth removal. In total, PDLs from 9 healthy donors were used in this study, 6 for flow cytometry analysis and PDL cell seeding, and 3 for ex vivo HSV-1 infection of PDL fragments (donors A, B and C). This study is classified as non-interventional research involving acts devoid of risks for the patients (category 3 in the context of the French 'Jardé Law'). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study to inform him/her of his/her right to oppose the use of his/her specimens and data for research purposes (authorized biomedical collection N°DC-2022–5040, French Research Ministry).

Extracted teeth were immersed in phosphate-buffered saline (PBS) containing antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) and antifungals (2.5 µg/mL amphotericin B and 0.5 µg/mL caspofungin) and kept at 4 °C for less than 24 h. After 3 successive washings in PBS, rare pieces of gingival tissue still attached to the tooth were carefully removed by dissection. PDL tissues were then collected through scalpel-scraping of the mid-third of the root surface, washed with PBS and chopped into small pieces of tissue a few millimeters in size (PDL fragments). A single-cell suspension of PDL cells was obtained after digestion of PDL fragments with 3 mg/mL type I collagenase and 4 mg/mL dispase II (Life Science, Sunnyvale, CA, USA) for 30 to 40 min at 37 °C with vigorous shaking every 10 min. The digested PDL fragments were then passed through a 70 µm cell strainer (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) and centrifuged at 400× *g* for 5 min. The cells were resuspended in α-MEM supplemented with 0.292 mg/mL L-Glutamine and 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), and then counted using a Malassez-counting chamber.

4.2. PDL Cell Culture and Differentiation

PDL single-cell suspensions were plated into 6-well plates (Falcon, Dutscher, Bernolsheim, France) containing α-MEM supplemented with 20% heat-inactivated FCS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL amphotericin B and 0.5 µg/mL caspofungin and then incubated at 37 °C with 5% CO_2 in a humidified atmosphere. Cells were typically plated at a density of 3×10^5 cells per well and dissociated with 0.25% Trypsin/0.02% EDTA upon reaching 80–90% confluency. The cells were subcultured in α-MEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, defined as a complete culture medium (CCM). Cells from passages P1 to P7 were used for experiments. For osteogenic and adipogenic cell differentiation, PDL cells at 80% confluency were incubated for 4 weeks, either in osteogenic medium (CCM supplemented with 50 µg/mL L-ascorbic acid 2-phosphate, 5 mM sodium β-glycerophosphate, 100 nM dexamethasone) or in adipogenic medium (CCM supplemented with 10 µg/mL insulin (Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 nM dexamethasone, 1 µM rosiglitazone). Osteogenesis was demonstrated by alizarin red S staining of calcium deposits, while adipogenesis was demonstrated using oil red O staining of lipids. For chondrogenic differentiation, PDL cells (4×10^5 cells in 20 µL of CCM) were placed into 12-well plates and incubated at 37 °C with 5% CO_2 for 3 h attachment period to create micromass cultures. After gently adding additional CCM, the

micromass cultures were rested for an additional 24 h. Differentiation was carried out by adding chondrogenic medium (CCM with 50 µg/mL L-ascorbic acid 2-phosphate, 100 nM dexamethasone, 1× insulin-transferrin-selenium premix and 10 ng/mL TGF-β3; Peprotech, Cranbury, NJ, USA). Micromasses were harvested after 3 weeks of differentiation, rinsed twice with PBS and fixed with 4% formaldehyde solution for 24 h. Micromasses were embedded in paraffin and sectioned as 5 µm thick slices. The paraffin sections were then deparaffinized in xylene, rehydrated and stained with alcian blue to visualize proteoglycans. The specificity of the detection procedures used to visualize differentiated cells was verified using non-differentiated cells as controls.

4.3. Flow Cytometry Analysis

Flow cytometry analysis of single-cell suspensions of PDL cells and cultured PDL cells was performed with fluorochrome-conjugated mouse monoclonal antibodies for the detection of cell surface markers (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Hematopoietic cells were identified as cells expressing CD45. Mesenchymal cells were identified as stromal cells expressing the mesenchymal cell markers endoglin (CD105) and CD29 [26]. The gating strategy of flow cytometry analysis was as follows: the region of interest (ROI) was placed on a size/structure dot-plot (FSC/SSC) to eliminate debris and residues from dissociation. Within this ROI, doublets were excluded by size and then by structure. The viability of this population was then assessed by excluding 7-AAD-positive cells. From the pool of viable cells, CD45 cells were then discriminated. Finally, the expression of CD105 and CD29 markers was assessed on $CD45^{neg}$ cells. Analysis was performed using a BD FACS Canto II, and results were analyzed with FACSDiva software v. 6.1.3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.4. HSV-1 Infection Assays

The HSV-1 isolate used in this study was a clinical strain collected from the oral cavity of a healthy individual. It was initially propagated and characterized on Vero cells, a highly permissive kidney epithelial cell lineage from the African green monkey. HSV-1 viral stock was then produced in α-MEM medium using PDL cells as amplifying cells. The viral titer of the stock was determined by testing serial viral dilutions to define the 50% tissue culture infectious dose (TCID50) that promoted a cytopathic effect on PDL cells [30]. The multiplicity of infection (MOI) was calculated using the Reed and Muench method.

HSV-1 infection of PDL cells: In total, 6 different batches of PDL cells (from different donors) were used for HSV-1 infection and analyzed with IF staining and RT-PCRs. Of note, the cultured cells were initially characterized by IF vimentin staining, confirming their fibroblastic nature (Figure S1), which provided the basis for their use in subsequent infection experiments. Sub-confluent monolayers of PDL cells, cultured either in plastic wells (for RNA extraction) or on treated-glass slides (for IF staining), were infected with HSV-1 at different MOIs. At 1 h, 6 h, or 24 h p.i., PDL cells were rinsed twice with α-MEM medium before RNA extraction or IF staining. HSV-1 infections were also performed in the presence of 1 and 10 µg/mL of peptidoglycan (PEG) from *Micrococcus luteus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

HSV-1 infection of PDL fragments: PDL fragments were infected by direct incubation in a cell-free virus suspension (4×10^7 TCID50/mL) for 1 h at 37 °C. Subsequently, PDL fragments were washed twice by centrifugation in α-MEM medium and incubated for an additional 3 h at 37 °C in 1 mL of α-MEM medium before the tissues were lysed for RNA extraction (RNeasy Mini kit®, Qiagen, Hilden, Germany).

4.5. Immunofluorescent Staining

PDL cells were seeded in CCM on type I collagen-coated coverslips at 50% confluency for 2 days. Adherent PDL cells were infected with HSV-1 at MOI 100 for 1 h and 24 h, then rinsed twice with 1× PBS at room temperature and fixed in 3.7% paraformaldehyde/PBS for 15 min. The cells were then quenched in 50 mM NH_4Cl/PBS for 30 min and permeabilized

for 4 min in 0.1% Triton X-100/PBS. After two 5 min washes in PBS, cells were incubated for 60 min in a 1% bovine serum albumin (BSA)/PBS solution to block non-specific antibody binding. The incubation with mouse primary antibodies (diluted 1:200 in 1% BSA/PBS) was carried out overnight at 4 °C. Mouse primary antibodies were HSV-1 ICP0 (11060), ICP4 (H943) and ICP8 (10A3) from Santa Cruz Biotechnology, human vimentin (Clone V9) from Dako/Agilent (Glostrup, Denmark) and mouse IgG1 Isotype Control from ThermoFischer Scientific (Waltham, MA, USA). After three 3 min washes in PBS, cells were incubated with a fluorescent secondary antibody (diluted 1:1000 in 1% BSA/PBS) and co-stained with 2 µg/mL DAPI. The secondary antibody was an Alexa Fluor® 488-conjugated donkey anti-mouse IgG H&L from Abcam (Cambridge, UK). After a 30 min incubation in the dark at room temperature, the coverslips were washed three times for 3 min in PBS, once with distilled water and mounted onto microscope slides using Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma Aldrich, L'lsle-d'Abeau Chesnes, France). Image acquisition was performed using a Zeiss microscope (Oberkochen, Germany). Unless otherwise indicated, all reagents used for differentiation and staining were from Sigma Aldrich (L'lsle-d'Abeau Chesnes, France).

4.6. RNA Extraction and Reverse-Transcription PCR (RT-PCR) Analysis

PDL cells grown on plastic wells were lysed for RNA extraction according to the manufacturer's recommendations (RNeasy Mini kit®, Qiagen). RNA extraction from PDL fragments was performed using a GentleMACS M Tube (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) with the RNA_01 program (for fresh tissue) and Qiagen RNeasy Mini kit® (tissues protocol) according to the manufacturers' instructions. RNA quantification was performed using a microvolume spectrophotometer (SimpliNano™, Biochrom, Holliston MA, USA).

Viral and human transcripts were detected by RT-PCR using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, USA). PCR experiments were performed using QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™) in a 20 µL final volume using 20 ng cDNA from PDL cells and 5.6 ng cDNA from PDL fragments (equivalent RNA). Amplification conditions were as follows: 95 °C, 10 min; (95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min) cycled 40 times. Each sample was run in triplicates using specific primer sets (Table 1) for the immediate-early (ICP0 and ICP4) and early (ICP8) HSV-1 viral transcripts, pro-inflammatory interleukin-1 beta (IL-1β), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), type 1 interferons alpha-1 and beta-1 (IFN-α and IFN-β) and type III interferon lambda 1 (IFN-λ). Relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, with the GAPDH gene as the reference gene. Uninfected PDL cells were used as reference samples to normalize PDL cell gene expression, and uninfected PDL fragments from the same donors served as reference controls for comparison with HSV-1 exposed fragments.

Table 1. List of primers.

	Forward Primer (5′ → 3′)	**Reverse Primer (5′ → 3′)**
GAPDH	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT
ICP0	GTCGCCTTACGTGAACAAGAC	GTCGCCATGTTTCCCGTCTG
ICP4	CGACACGGATCCACGACCC	GATCCCCCTCCCGCGCTTCGTCCG
ICP8	CGACAGTAACGCCAGAAG	GGAGACAAAGCCCAAGAC
IFN-α	AGAAGGCTCCAGCCATCTCTGT	TGCTGGTAGAGTTCGGTGCAGA
IFN-β	CTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGC	TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA
IFN-λ	AACTGGGAAGGGCTGCCACATT	GGAAGACAGGAGAGCTGCAACT
IL-1β	CACGATGCACCTGTACGATCA	GTTGCTCCATATCCTGTCCCT
TNF-α	GCTGCACTTTGGAGTGATCG	GCTTGAGGGTTTGCTACAACA

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25158466/s1.

Author Contributions: M.O., contributed to design, data acquisition and interpretation, critically revised the manuscript; M.C., contributed to design, data acquisition and interpretation, critically revised the manuscript; C.-V.O., contributed to design, data acquisition and interpretation, critically revised the manuscript; S.V., contributed to design, data acquisition and interpretation, critically revised the manuscript; A.P., contributed to design, data acquisition and interpretation, critically revised the manuscript; L.T., contributed to data interpretation, drafted and critically revised the manuscript; A.D., contributed to conception, design, data interpretation, drafted and critically revised the manuscript; R.M., contributed to conception, design, data acquisition and interpretation, critically revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by University Côte d'Azur grant number CSI 2018.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study (authorized biomedical collection N°DC-2022–5040, French Research Ministry).

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Materials, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Acknowledgments: The authors acknowledge S. Touret and P. Cochais for providing the extracted teeth.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Beertsen, W.; McCulloch, C.A.; Sodek, J. The periodontal ligament: A unique, multifunctional connective tissue. *Periodontology* **1997**, *13*, 20–40. [CrossRef]
2. Nanci, A.; Bosshardt, D.D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology* **2006**, *40*, 11–28. [CrossRef]
3. de Jong, T.; Bakker, A.D.; Everts, V.; Smit, T.H. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J. Periodontal Res.* **2017**, *52*, 965–974. [CrossRef] [PubMed]
4. Seo, B.M.; Miura, M.; Gronthos, S.; Bartold, P.M.; Batouli, S.; Brahim, J.; Young, M.; Robey, P.G.; Wang, C.Y.; Shi, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **2004**, *364*, 149–155. [CrossRef] [PubMed]
5. Nagatomo, K.; Komaki, M.; Sekiya, I.; Sakaguchi, Y.; Noguchi, K.; Oda, S.; Muneta, T.; Ishikawa, I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.* **2006**, *41*, 303–310. [CrossRef]
6. Park, O.J.; Kim, A.R.; So, Y.J.; Im, J.; Ji, H.J.; Ahn, K.B.; Seo, H.S.; Yun, C.H.; Han, S.H. Induction of Apoptotic Cell Death by Oral Streptococci in Human Periodontal Ligament Cells. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 738047. [CrossRef]
7. Nilsson, B.O. Mechanisms involved in regulation of periodontal ligament cell production of pro-inflammatory cytokines: Implications in periodontitis. *J. Periodontal Res.* **2021**, *56*, 249–255. [CrossRef]
8. Zhang, Z.; Deng, M.; Hao, M.; Tang, J. Periodontal ligament stem cells in the periodontitis niche: Inseparable interactions and mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* **2021**, *110*, 565–576. [CrossRef]
9. Chaikeawkaew, D.; Everts, V.; Pavasant, P. TLR3 activation modulates immunomodulatory properties of human periodontal ligament cells. *J. Periodontol.* **2020**, *91*, 1225–1236. [CrossRef] [PubMed]
10. Jonsson, D.; Nebel, D.; Bratthall, G.; Nilsson, B.O. The human periodontal ligament cell: A fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J. Periodontal Res.* **2011**, *46*, 153–157. [CrossRef]
11. James, C.; Harfouche, M.; Welton, N.J.; Turner, K.M.; Abu-Raddad, L.J.; Gottlieb, S.L.; Looker, K.J. Herpes simplex virus: Global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ.* **2020**, *98*, 315–329. [CrossRef] [PubMed]
12. Miller, C.S.; Danaher, R.J. Asymptomatic shedding of herpes simplex virus (HSV) in the oral cavity. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2008**, *105*, 43–50. [CrossRef] [PubMed]
13. Higgins, C.R.; Schofield, J.K.; Tatnall, F.M.; Leigh, I.M. Natural history, management and complications of herpes labialis. *J. Med. Virol.* **1993**, *41* (Suppl. S1), 22–26. [CrossRef]
14. Whitley, R.J. Herpes simplex encephalitis: Adolescents and adults. *Antivir. Res.* **2006**, *71*, 141–148. [CrossRef]
15. Verzosa, A.L.; McGeever, L.A.; Bhark, S.J.; Delgado, T.; Salazar, N.; Sanchez, E.L. Herpes Simplex Virus 1 Infection of Neuronal and Non-Neuronal Cells Elicits Specific Innate Immune Responses and Immune Evasion Mechanisms. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 644664. [CrossRef]
16. Wu, D.; Wang, C.; Pang, P.; Kong, H.; Lin, Z.; Wang, H.; Chen, X.; Zhao, J.; Hao, Z.; Zhang, T.; et al. The association between herpes simplex virus type 1 infection and Alzheimer's disease. *J. Clin. Neurosci.* **2020**, *82 Pt A*, 63–70. [CrossRef]
17. Slots, J. Periodontal herpesviruses: Prevalence, pathogenicity, systemic risk. *Periodontology* **2015**, *69*, 28–45. [CrossRef]
18. Chen, C.; Feng, P.; Slots, J. Herpesvirus-bacteria synergistic interaction in periodontitis. *Periodontology* **2020**, *82*, 42–64. [CrossRef] [PubMed]
19. Arduino, P.G.; Cabras, M.; Lodi, G.; Petti, S. Herpes simplex virus type 1 in subgingival plaque and periodontal diseases. Meta-analysis of observational studies. *J. Periodontal Res.* **2022**, *57*, 256–268. [CrossRef]

20. Song, Y.; Liu, N.; Gao, L.; Yang, D.; Liu, J.; Xie, L.; Dan, H.; Chen, Q. Association between human herpes simplex virus and periodontitis: Results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2009–2014. *BMC Oral Health* **2023**, *23*, 675. [CrossRef]
21. Vincent-Bugnas, S.; Vitale, S.; Mouline, C.C.; Khaali, W.; Charbit, Y.; Mahler, P.; Precheur, I.; Hofman, P.; Maryanski, J.L.; Doglio, A. EBV infection is common in gingival epithelial cells of the periodontium and worsens during chronic periodontitis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80336.
22. Olivieri, C.V.; Raybaud, H.; Tonoyan, L.; Abid, S.; Marsault, R.; Chevalier, M.; Doglio, A.; Vincent-Bugnas, S. Epstein-Barr virus-infected plasma cells in periodontitis lesions. *Microb. Pathog.* **2020**, *143*, 104128. [CrossRef] [PubMed]
23. Tonoyan, L.; Olivieri, C.V.; Chevalier, M.; Marsault, R.; Doglio, A. Detection of Epstein-Barr virus infection in primary junctional epithelial cell cultures. *J. Oral Microbiol.* **2024**, *16*, 2301199. [CrossRef] [PubMed]
24. Zhu, S.; Viejo-Borbolla, A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence* **2021**, *12*, 2670–2702. [CrossRef]
25. Grinde, B. Herpesviruses: Latency and reactivation—Viral strategies and host response. *J. Oral Microbiol.* **2013**, *5*, 22766. [CrossRef] [PubMed]
26. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [CrossRef] [PubMed]
27. Thier, K.; Petermann, P.; Rahn, E.; Rothamel, D.; Bloch, W.; Knebel-Morsdorf, D. Mechanical Barriers Restrict Invasion of Herpes Simplex Virus 1 into Human Oral Mucosa. *J. Virol.* **2017**, *91*, e01295-17. [CrossRef] [PubMed]
28. Zuo, Y.; Whitbeck, J.C.; Haila, G.J.; Hakim, A.A.; Rothlauf, P.W.; Eisenberg, R.J.; Cohen, G.H.; Krummenacher, C. Saliva enhances infection of gingival fibroblasts by herpes simplex virus 1. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0223299. [CrossRef] [PubMed]
29. Burgos, J.S.; Ramirez, C.; Sastre, I.; Alfaro, J.M.; Valdivieso, F. Herpes simplex virus type 1 infection via the bloodstream with apolipoprotein E dependence in the gonads is influenced by gender. *J. Virol.* **2005**, *79*, 1605–1612. [CrossRef]
30. Ramakrishnan, M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* **2016**, *5*, 85–86. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Chapitre 3 : Détection quantitative simultanée à haut débit du microbiote oral ; Révéler la complexité

I. Technologies pour l'étude des microbiotes : avancées et limites

Ces dernières années, l'étude des microbiotes humains et de leurs altérations a pris une place centrale dans la recherche scientifique. Les microbiotes jouent des rôles essentiels dans la santé humaine, ce qui a conduit à un essor considérable des recherches dans ce domaine (Scherz, Greub, and Bertelli 2022). La majorité de ces études se focalisent sur l'analyse de la complexité des microbiotes, s'appuyant sur des méthodes combinant des analyses génomiques, protéomiques et transcriptomiques.

Traditionnellement, l'identification des bactéries s'appuyait sur des techniques de culture en milieu liquide ou sur boite de Pétri, accompagnées de tests phénotypiques, tels que la coloration de Gram et l'évaluation de besoins spécifiques en nutriments ou en oxygène. Des tests biochimiques, basés sur le métabolisme des sucres ou la production d'enzymes spécifiques, complétaient ces approches (Lau et al. 2015). Cependant, ces méthodes présentent des limitations importantes, puisqu'elles ne permettent de détecter que les bactéries cultivables. Or, il est désormais bien établi que 99% des bactéries présentes dans des environnements comme le sol ou l'intestin humain sont non cultivables par ces techniques classiques (Schloss and Handelsman 2005). Cette incapacité à cultiver ces bactéries s'explique souvent par des conditions de croissance très spécifiques difficiles à reproduire en laboratoire, ou parce qu'elles se trouvent dans des états métaboliquement inactifs, comme les spores.

L'étude des microbiotes, qui regroupent des ensembles complexes de micro-organismes coexistant dans un même environnement, ajoute une complexité supplémentaire. Les interactions entre micro-organismes, leurs exigences de croissance différentes (aérobie, anaérobie, micro-aérobie), ainsi que la diversité des niches écologiques qu'ils occupent, compliquent encore plus leur étude en laboratoire.

Avec le développement de nouvelles technologies, notamment la métagénomique, des progrès significatifs ont été réalisés dans l'étude des microbiotes. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a révolutionné ce domaine, en permettant la découverte de nombreux genres et espèces bactériennes jusqu'alors inconnus. Cette méthode a profondément impacté la recherche clinique, offrant une identification plus rapide et précise des micro-organismes, y compris ceux qui sont viables mais non cultivables (Lau et al. 2015). Le NGS offre une vision globale et quasi-exhaustive des organismes présents dans un environnement donné, incluant les bactéries complexes non-cultivables, et permet d'accélérer le diagnostic clinique, orientant rapidement vers des traitements adaptés. De plus, le NGS permet d'identifier non seulement les bactéries, mais aussi virus, champignons et parasites présentes dans un échantillon. Le séquençage se démocratise et devient plus accessible avec des technologies comme celles développées par Oxford Nanopore Technologies (https://nanoporetech.com/products/sequence/minion), qui permettent de réaliser des expériences de séquençage à petite échelle, pour des laboratoires de recherche hors des plateformes spécialisées.

Parmi les approches utilisées, le séquençage du gène 16S est couramment employé pour identifier les espèces bactériennes présentes dans un milieu donné et déterminer leurs abondances respectives. Ce gène, qui code pour l'ARN ribosomique 16S, est spécifique aux bactéries et contient des régions variables permettant de discriminer les différents groupes bactériens au niveau de la famille, du genre et parfois l'espèce. Cependant, cette méthode montre des limites pour distinguer des espèces bactériennes étroitement apparentées (Lau et al. 2015). De plus, elle ne permet pas une quantification précise, car le nombre de copies du gène ARN16S peut varier en fonction des espèces bactériennes, reflétant des différences de taille du génome, et des taux de croissance (Case et al. 2007). En conséquence, les résultats exprimés sont souvent des abondances relatives plutôt que des quantifications exactes.

L'analyse bio-informatique des données générées par le séquençage en grandes quantités reste un défi majeur. Bien que le NGS offre une vue d'ensemble précieuse, elle nécessite des outils bio-informatiques sophistiqués et une expertise pour traiter et interpréter des données. De plus, bien que la technologie soit de plus en plus accessible, elle demeure coûteuse pour de nombreuses applications.

En parallèle des avancées en métagénomique, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) a également joué un rôle crucial dans la détection et la quantification des espèces bactériennes spécifiques. Cette technologie offre des résultats quantitatifs précis et une sensibilité extrême, capable de détecter une dizaine de copies d'un acide nucléique spécifique au sein d'une population complexe. La spécificité des amorces assure une identification fiable des cibles microbiennes (Lau et al. 2015). Cependant, la PCR a ses limites, notamment parce qu'elle restreint l'analyse aux cibles prédéfinies, sans fournir d'informations sur l'ensemble des micro-organismes présents dans un échantillon. Les progrès récents, tels que la qPCR en temps réel, ont considérablement amélioré la fiabilité, la spécificité, et la quantification, tout en facilitant l'automatisation complète des tests diagnostiques pour de nombreux pathogènes. Il existe désormais une multitude de kits PCR disponibles, allant des tests ciblant spécifiquement un seul agent pathogène aux tests multiplexés couvrant plusieurs pathogènes dans des panels spécifiques (par exemple : Urinary Tract Infections, Qiagen, #BAID-1205Y). (Lewinski et al. 2023). Toutefois, les systèmes automatisés à grande échelle restent coûteux et nécessitent des équipements spécialisés, ce qui limite leur utilisation aux laboratoires bien équipés, comme les laboratoires d'analyses médicales. De plus, la mise au point d'essais PCR personnalisés demeure un processus lourd et complexe.

Enfin, les études fonctionnelles offrent des perspectives intéressantes pour comprendre le rôle des micro-organismes au sein du microbiote. L'analyse de l'expression de gènes ou l'activation de voies métaboliques spécifiques peut fournir des informations cruciales sur les interactions des micro-

organismes avec leur environnement et leur hôte.

L'émergence de la salivaomique, qui se concentre sur la métabolomique des composants salivaires, ouvre la voie à la recherche de biomarqueurs salivaires, utiles pour diagnostiquer diverses pathologies et comprendre le rôle de la salive dans la santé bucco-dentaire (Zhang et al. 2016).

II. Développement de l'outil de détection et de quantification du microbiote oral sur le Biomark™ HD

1. La PCR microfluidique à haut débit : le système Biomark™ HD

La PCR conventionnelle, bien qu'efficace pour identifier et quantifier des espèces spécifiques, présente des limites importantes, notamment une faible représentativité de la complexité microbienne, et des coûts élevés, surtout pour l'analyse de grandes séries d'échantillons biologiques. En revanche, le séquençage, bien qu'indispensable pour une analyse fine de la diversité microbienne, ne permet ni une quantification précise, ni une identification détaillée des espèces bactériennes. Le choix de la méthode d'étude des microbiotes dépend donc essentiellement de la question à laquelle on souhaite répondre.

Notre objectif est d'explorer les liens entre les états de santé physio-pathologiques de l'organisme et l'écosystème oral. Cela inclut principalement l'étude du microbiote oral, le suivi des paramètres inflammatoires salivaires et l'évaluation de la santé bucco-dentaire (détaillé dans la section « Validation de l'array de détection et de quantification du microbiote oral par PCR microfluidique sur des prélèvements biologiques ») et de mode de vie particulier, comme par exemple, la pratique sportive (détaillé dans le Chapitre 4 : Impact du sport d'endurance sur l'écosystème oral ; Frontières du mode vie). Dans ce contexte, nous avons choisi la technologie Biomark™ HD développée par Standard Biotools pour détecter et quantifier un panel représentatif de micro-organismes oraux (bactéries et virus), dans une large série de prélèvements biologiques (Figure 13). Ce système de qPCR microfluidique à haut débit surmonte les limitations de la qPCR conventionnelle en permettant l'analyse simultanée d'un grand de nombre de gènes et cela, dans une large série d'échantillons.

Le Biomark™ HD utilise une puce microfluidique où les échantillons et les amorces sont pipetés manuellement dans des entrées individuelles, puis automatiquement distribués via un réseau de micro-canaux, de vannes, et de chambres de réaction (9 nL) formant l'ensemble du circuit de fluide intégré (IFC). Le système gère automatiquement le mélange des réactifs à l'échelle du nanolitre (Olwagen, Adrian, and Madhi 2019). La pré-amplification est nécessaire pour des détections et quantifications

précises à cette échelle puisqu'une très faible quantité d'échantillon est présent initialement. Ce dispositif permet de réaliser jusqu'à 9 216 réactions PCR en une seule analyse qPCR (96 échantillons × 96 cibles), avec d'autres formats de plaque disponibles (48x48, 192x24).



Figure 13 : Présentation de la technologie Biomark™ HD de Standard Biotools et d'une puce microfluidique présentant le circuit de fluide intégré (IFC).

Les principaux avantages du Biomark™ HD résident dans sa capacité à détecter et quantifier simultanément plusieurs cibles dans un même échantillon, améliorant ainsi la fiabilité des résultats. Contrairement aux méthodes classiques, plusieurs gènes peuvent ici être analysés en parallèle, ce qui réduit le temps d'expérimentation et minimise les variations expérimentales. De plus, ce système permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en parallèle, ce qui est crucial pour des études telles que des recherches sur des cohortes, où de grandes séries d'échantillons doivent être analysés. La faible consommation d'échantillons, un atout dans les situations où ils sont limités, permet d'effectuer plusieurs analyses avec un minimum de matériel biologique. Enfin, cette technologie se démarque par un coût par réaction inférieur à celui de la qPCR conventionnelle et un gain de temps considérable : une expérience nécessitant 45 qPCR classiques peut être réalisée en une seule expérience avec le Biomark™ HD.

En conclusion, la technologie Biomark™ HD est un outil de choix pour les chercheurs souhaitant effectuer des études à grande échelle, grâce à sa capacité de d'analyse massive, son faible coût et sa consommation réduite de matériel biologique, répondant ainsi aux besoins actuels de la biologie

moléculaire.

b. Utilisation de la technologie Biomark™ HD pour l'étude du microbiote oral

Dans le cadre de l'analyse du microbiote oral, nous avons choisi d'utiliser la technologie Biomark™ HD pour analyser différents types d'échantillons provenant de la cavité buccale. Plusieurs types de prélèvements sont en effet réalisables afin d'explorer la diversité microbienne orale, chacun apportant des informations spécifiques et différentes. Le prélèvement salivaire (crachat salivaire) offre sans doute une vision assez globale du microbiote oral, tandis que d'autres techniques de prélèvements permettent d'obtenir des résultats plus spécifiques et détaillés concernant une niche écologique particulière, comme l'écouvillonnage, le curetage, le prélèvement de plaque dentaire ou encore l'utilisation de pointe papier pour analyser le contenu de la poche parodontale.

L'utilisation des prélèvements oraux pour le diagnostic des agents pathogènes est une approche relativement récente, qui présente de nombreux avantages. C'est une méthode non invasive, qui minimise le stress chez le patient, permet de réaliser plusieurs tests à partir d'un même échantillon et représente une alternative plus économique que les prélèvements sanguins.

Grâce à la technologie Biomark™ HD, nous avons pu réaliser 4608 points finaux de qPCR en une seule analyse, en traitant simultanément 48 échantillons et 48 cibles microbiologiques. Le format de plaque 96x96 nous permet d'obtenir pour chaque échantillon, des résultats en duplicata pour les échantillons ainsi que pour chaque couple d'amorce (donc quadruplicata à la finalité).

c. Définition du panel de bactéries et virus sélectionné pour l'étude

La cavité orale est l'une des niches écologiques les plus diversifiées de l'organisme, abritant près de 1000 espèces bactériennes, ainsi que des virus, champignons, et autres micro-organismes. Afin de développer un outil performant de détection et de quantification du microbiote oral, nous avons sélectionné un panel représentatif de 38 bactéries, comprenant des espèces commensales et pathogènes, notamment celles impliquées dans des pathologies orales, telles que la parodontite et la gingivite (Figure 14).

La définition de ce panel repose initialement sur la classification par complexe de Socransky (détaillé dans la section « Étiopathogénie des maladies parodontales »), qui a ensuite été enrichie en intégrant les récentes données de la littérature pour inclure un spectre plus large d'espèces pertinentes. Parmi les bactéries ajoutées en raison de leur rôle émergeant dans les maladies parodontales, on retrouve

Streptococcus mutans (Neves et al. 2018), *Corynebacterium matruchotii* (Esberg et al. 2020), *Centipeda periodontii* (Inchingolo et al. 2022), *Dialister pneumosintes* (Doan et al. 2000), *Selenomonas sputigena* (Griffen et al. 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Dong et al. 2022), *Haemophilus parainfluenzae* (Naginyte et al. 2019). Ces bactéries ont été regroupées dans un nouveau « complexe », que nous avons qualifié à ce stade de « complexe infectieux », afin de prendre en compte leur possible implication dans les pathologies infectieuses orales.

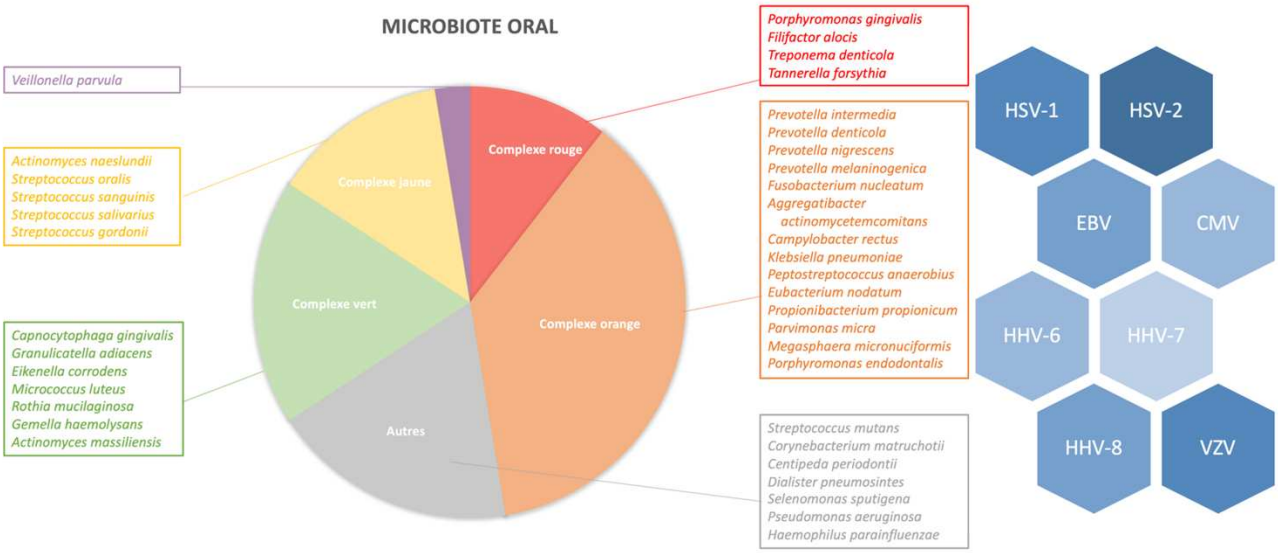


Figure 14 : Sélection des espèces microbiennes pour l'analyse du microbiote oral.
Cette figure illustre la sélection de 38 espèces bactériennes orales et des 8 HHV choisis pour l'étude du microbiote oral. Les bactéries sont organisées selon la classification de Socransky, qui répartit les espèces en complexes microbiens selon leur implication dans les processus pathogènes liés aux maladies parodontales. Ce panel complet offre une vue d'ensemble sur les interactions microbiennes dans la cavité orale, permettant d'examiner leur rôle dans le maintien de la santé orale ainsi que dans le développement de maladies parodontales et autres déséquilibres microbiens.

En parallèle, nous avons également souhaité intégrer de manière innovante dans un panel représentatif du microbiote oral, la détection de virus, et notamment des 8 HHV. Cette approche repose sur l'hypothèse que l'association des cibles virales et bactériennes pourrait renforcer la pertinence des signatures microbiennes (selon la théorie de la synergie viro-bactérienne de (Contreras and Slots 2000)), étant donné que les dynamiques des réponses virales et bactériennes diffèrent souvent, mais que leur interaction pourrait jouer un rôle clé dans l'état de santé bucco-dentaire. En combinant ces séquences bactériennes et virales, nous avons développé un premier « array » dédié à la microbiologie

orale, permettant une analyse ciblée, quantitative et à haut débit. Cet outil innovant offre un potentiel considérable pour les études translationnelles, dont l'objectif est d'étudier les variations de cibles représentatives du microbiote oral en relation avec les maladies bucco-dentaires, et au de-là, avec la santé globale de l'individu.

2. Matériels et méthodes de la mise en place de la technologie

Le choix du panel de micro-organismes ayant été réalisé afin de développer cet outil d'analyse du microbiote oral à l'aide de la technologie Biomark^{TM} HD, plusieurs étapes méthodologiques ont été nécessaires. Tout d'abord, il a fallu disposer, pour chaque espèce étudiée, d'un témoin ADN positif calibré, servant d'étalon pour les PCR. Concernant les bactéries, chaque souche bactérienne cible a été obtenue auprès de différents fournisseurs, amplifiée par culture, et son ADN génomique a été extrait, purifié et quantifié. Pour les virus, des plasmides contenant les séquences cibles virales ont été synthétisés. Parallèlement, des couples d'amorces oligonucléotidiques spécifiques ont été définis et produits pour cibler les gènes caractéristiques de chaque espèce bactérienne et virale. Enfin, des gammes étalons ont été testées, permettant de valider la qualité des réactions PCR en termes de spécificité, efficacité, reproductibilité et sensibilité. Ces tests ont d'abord été réalisés et optimisés sur une qPCR conventionnelle, puis sur la technologie du Biomark^{TM} HD, permettant ainsi d'obtenir la quantification précise du nombre de copies par µg d'ADN des espèces dans un échantillon donné.

Bien que des validations supplémentaires soient encore nécessaires, le travail accompli à ce jour permet de disposer d'une première analyse par PCR haut débit du microbiote oral, utilisable pour l'analyse de larges collections de prélèvements oraux.

a. Constitution d'une librairie d'ADN étalons

Génomes bactériens

Des souches bactériennes pures, sous forme lyophilisées, ont été obtenues auprès de diverses institutions de référence, telles que l'Institut Pasteur (CIP), la Collection Universitaire de Cultures de Göteborg (CCUG) ou encore l'Institut Leibniz, Collection Allemande de Microorganismes et Cultures Cellulaires (DSMZ) (Tableau 3). Chaque souche bactérienne a été cultivée sur gélose Columbia Blood à des températures de 30°C ou 37°C, selon les exigences de la souche. Selon les besoins en oxygène des différentes souches, les conditions de culture pouvaient être aérobie, anaérobie, ou microaérobie avec 5% de CO_2.

Pour l'extraction de l'ADN génomique des bactéries, deux approches ont été utilisées selon la classification Gram des souches :

- Les bactéries Gram-négatives :

L'extraction de l'ADN génomique des bactéries Gram-négatives a été réalisée en utilisant le QIAamp DNA Mini Kit®. Après une centrifugation des cultures, les bactéries ont été collectées sous forme de culot et resuspendues dans 180 µL de tampon ATL (fourni avec le kit). Le protocole « Isolation of bacterial DNA from biological fluids » a été suivi à partir de cette étape.

- Les bactéries Gram-positives :

L'extraction de l'ADN génomique des bactéries Gram-positives a également été réalisée avec le QIAamp DNA Mini Kit®, mais une étape enzymatique supplémentaire a été nécessaire pour digérer la paroi cellulaire de ces bactéries. En effet, le culot bactérien obtenu après centrifugation a été resuspendu dans 180 µL d'une solution enzymatique (20 mg/mL de lysozyme, 20 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM d'EDTA, 1,2 % de Triton). Le protocole « Isolation of genomic DNA from Gram-positive bacteria » a ensuite été suivi.

La quantification des ADN génomiques extraits, qu'ils proviennent des bactéries Gram-négatives ou Gram-positives, a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à microvolume (Nanodrop Lite Plus™).

Génomes viraux

En ce qui concerne certains HHV, les gènes cibles ont été synthétisés et clonés dans des vecteurs plasmidiques, puis produits sous forme d'ADN purifiés ; ces étapes ont été sous-traitées et réalisées par la firme Thermofisher Scientific. Notre travail a notamment concerné la sélection des gènes cibles au sein de chaque génome viral (Tableau 3) : *lmp1* pour EBV, *US7* pour HSV-1, *ppUL83* pour CMV, *U90* pour HHV-6 et *UL27* pour HSV-2. Concernant les autres HHV, des plasmides spécifiques ont été commandés via Addgene : le plasmide #60845 pour le gène *ORF68* de VZV, le plasmide #26693 pour le gène *U69* de HHV-7 et le plasmide #129744 pour le gène *ORF31* de HHV-8.

Design des couples d'amorces nucléotidiques

Les amorces utilisées pour la détection des bactéries et des virus ont été définies de manière à répondre à des critères optimisés pour la PCR. Les caractéristiques spécifiques incluent la température de fusion (Tm), le pourcentage en guanine et cytosine (GC) et la taille des amplicons. Ces paramètres ont été

ajustés pour garantir des conditions de cycle PCR uniformes pour toutes les amorces. La teneur en GC varie entre 40% et 60%, tandis que la Tm varie entre 58°C à 61°C. La taille des amplicons varie entre 80 à 180 paires de bases. Chaque amorce cible un gène spécifique d'une bactérie ou d'un virus précis. Des comparaisons de séquences par NCBI BLAST ont été effectuées pour valider la spécificité des amorces et s'assurer que les séquences cibles étaient uniques et adaptées.

Tableau 3 : Caractéristiques des espèces microbiennes ciblées et séquences des amorces utilisées pour leur détection et quantification.

Ce tableau récapitule les espèces microbiennes sélectionnées pour l'étude, en indiquant leur provenance, ainsi que les gènes spécifiques associés à chaque espèce. Il fournit également les séquences des amorces (primers) conçues pour la quantification par qPCR.

Espèces	**Souches**	**Gènes cibles**	**Primers Forward 5'-> 3'**	**Primers Reverse 5' -> 3'**
Streptococcus oralis	CIP 102922T	sodA	CCAT GAC AAG CAT CAT CAA GCC T	AGA ATC TAC ATC AGC AAG CAA AGC
Streptococcus sanguinis	CIP 55.128T	sodA	GAT GAC ACC AGC AGA AAC ATC ACC	CCC AGC CAG AAC CAA AAC GAG
Streptococcus mutans	CIP 103220	sodA	GAT GCT GAA ACG ATG ACC CTT	CGT GAT TAA GAT GAC CGC CAC C
Streptococcus gordonii	CIP 105038	sodA	GAC AGC AGA AGA GAC AGC ACC	ATT GAC CAC CAA CCA AGC CC
Streptococcus salivarius	CIP 102505	sodA	TGT CTC CTG AAA AAC AAG AAC CAA CTG	GCC CAA CCT GAA CCA AAA CG
Actinomyces naeslundii	CIP 100654	smpB	GCG CCC ATA TTC CTG AGT ACC T	CCA CCG ATG AAG TAC AGC TCC AG
Granulicatella adiacens	CCUG 27809T	groL	TTA CAC CGC ATT TCT CGT CCA G	CCG TCG TTC CCC ACT TTT TCC
Veillonella parvula	CIP 60.1	groL	GCA AAA GTT ACT CGT TCT GCC	CAT CAT ACC GCC CAT ACC ACC

			C	
Capnocytophaga gingivalis	CIP 102945T	gyrB	CGT GAA TGC CCT TTC TAC TCA CC	ACC ACG CTT CTC TGT TTT TCC TT
Eikenella corrodens	CIP 70.75T	rpoB	CCG CTA CAC CTC TAT CCA CAT CG	TAC AAT GCC GCT TTC GTC CA
Gemella haemolysans	CIP 101126T	groL	GAC TGC AAC AAT TCT TGC ACA GG	GCA ACT TTC ACC GCT CTT TCC A
Rothia mucilaginosa	CIP 71.74	rpoB	CCT GCT TGC TAT CCA GAC CGA	TCT TCA AAA ATC TCA GCC AGA CCG
Micrococcus luteus	CIP A270T	clpX	GCT GAC CTG CTG AAA TGC TCG	TCG TCG CAG ATG TAG ACA CCC
Filifactor alocis	CCUG 47790T	secD	GGA AAT GCG GAA ATT AAC GGA GAC	AGA CGA TAT ACG GCA AGC ATC AG
Porphyromonas gingivalis	CIP 103683T	hmuY	AGG TGA AGT CGT AAA TGT TAC CGA CT	ACT TGA CTG TAA TAC GGC CGA G
Treponema denticola	DSM 14222	troA	GCA TGG TTG CCG ACA TAG C	CCC GCA CCC ATA AGA GCT T
Tannerella forsythia	DSM 102835	troA	GGT ACG TTA CCA CGA CCG TCA	CAA TCC CCA TCA CCC CAT ACG A
Prevotella intermedia	CCUG 24041T	rpoB	CGT ATT TCT AAG TTC CGT CGC AC	CGC CTT TCC TAA CAC GCT G
Prevotella denticola	CCUG 29542T	troA	CGA TAG TAA CCG TTC CAC TCC G	GCA TAG CAT TAC CGC AAT CCG
Fusobacterium nucleatum	CIP 104988T	rpoB	GGA CCA ATC AAA TCC ACT TGC TGA	TGA ACG TCT CTT ACT TCG AAT CCT G
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	CIP 101032	rpoB	GTT CTT CTA TCG CCA AAT GCC GG	CGC CAA TTC AAA TTC CGC CA
Corynebacterium	CIP 81.82T	HBA49_127	ATA CAA ACC	GGC AAA AAT CCA

matruchotii		00	CCA CCA CAA AAC C	ATA GCG TAA CCG
Peptostreptococcus anaerobius	CIP 104411T	groL	AGG CAG GTG GCA AGC TAC TTA	CGC CTT GAC AGC AAC AAC AT
Centipeda periodontii	CCUG 44586T	secD	TCA ACT CGC TTG GAC TGA CCG	ACC GTA TTC CCC TCT TCA TCG C
Dialister pneumosintes	CIP 107041T	rpoB	GGG AAG GAT ATA ACC ACG AAG ACG	GTC ACG AGC ATC ACA TTC ATA CTC T
Campylobacter rectus	DSM 3260	secD	TTT GAC CAC GCT CAT CAC CT	CAC GAC AGT ATC AAA CAT CCC GT
Prevotella melaninogenica	CIP 10491	gyrB	CAC AAC TAA CAC CCA CAC CAT GC	GTT GAC ATG CAC GAA AAA CTT CAC
Klebsiella pneumoniae	CIP 80.51	HS11286	ATA CGA AAA AGA CGA CAA TGG TGA GTT TG	ACG ATA GAG AAC GGC AGA CCT
Selenomonas sputigena	DSM 20758	clpX	ATA GAT GAT GCC GTT CTC CGC C	CCT CCT TGA CAT CCC GTT TGC
Pseudomonas aeruginosa	CIP 104060	rpoB	CGA AGT TGA AGC CGT TCC AGG	ACC TGA CCA AGT ACA CTC GTT CC
Prevotella nigrescens	CIP 105552T	nrfH	GTT TCC CGA GTT AAG TTA CCG ACA GAA	CAA TCC TCC TAA TCC CAC AAT CAC ACC
Haemophilus parainfluenzae	DSM 8978	rpoB	CAA CAA GAC CGC TTC ACG ACA AT	GCC CCC ACA TAA ACG ATA CC
Eubacterium nodatum	DSM 3993	rpoB	ACC GAC TCA AAC GAG ATC CTG T	ATC ACT TCC CAT TCC AAG AGC TC
Propionibacterium propionicum	CIP 101511	smpB	TCG TCG CCC AGA ACA AGA AG	AAG TCC CGA ACT CGT ACT CGG
Parvimonas micra	CIP 60.5	groL	GAC TTG CTA AAC TTG CTG	CCT TCT TCT ACC GCT GCT CTT GT

			GAG GAG	
Actinomyces massiliensis	CIP 109360T	gyrB	CGG CAC CAC TCA GAC CTT CTA C	AAG GCC ATC TGC TGG AAA CG
Porphyromonas endodontalis	DSM 24491	rpoB	ACG GCA GAG GAA GAA GAA GAA ATG	TGA TTA GGA GCA ACG ATG GGG
Megasphaera micronuciformis	DSM 17226	groL	GCA CCT ACC ATT ACG AAT GAC GG	TGC CTT CCT GAA TCA TAG CCT G
Epstein-Barr virus (EBV)		lmp1	CCT CAT CCT GCT CAT TAT TGC TCT C	GTT CAT CAC TGT GTC GTT GTC C
Herpes simplex virus 1 (HSV-1)		US7	TCC AAA ACC ACA ACC TCC CG	TGT GTA TAA AGC AAA TAC AGC TCC CC
Herpes simplex virus 2 (HSV-2)		UL27	CCA CCG ACC TCA AGT ACA ACC	CGC CAG CAC AAA CTC ATC G
Cytomegalovirus (CMV)		ppUL83	CCG ACA ACG AAA TCC ACA ATC C	ATT CTG ACC CTG AAC CGT AGC
Varicelle-Zona virus (VZV)		ORF68	CGG GGA ACG GTT AAT GCA AC	CTT TGG CCT TGG GGT TTT GG
HHV-6		U90	CCA GAG TCT TCC AAC AAC ATA GAG TCC	TCT TCC ATG TCA GAC TGT TCC TG
HHV-7		U69	ATG TTG GAT GAA CGC GGA TG	AAA TCA CCA CTT GCG TGC AG
HHV-8		ORF31	CAT GTC ACA AAA CAG AAA GAC TCT GCC	GCA TTC GGC GCC CCC

b. Efficacité des PCR mesurée par qPCR conventionnelle avec les gammes étalons

Le calcul du nombre de copies de chaque microorganisme a été déterminé à partir de la concentration d'ADN mesurée (en ng/µL) et en considérant la taille du génome de chaque espèce. L'utilisation de

l'outil en ligne NEBioCalculator (https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt) permet de convertir les concentrations d'ADN en nombre de copies. Les ADN étalons bactériens et viraux ont été dilués en série au dixième, afin de créer une gamme d'ADN allant de 1 à 10^8 copies par µL pour chaque microorganisme. Une qPCR conventionnelle a été réalisée avec les conditions suivantes : 95°C, 10 s ; (95°C, 15 s ; 60°C, 1 min) avec 40 cycles, permettant de générer des courbes étalons spécifiques pour chaque microorganisme. Ces dilutions ont ensuite servi de référence pour quantifier le nombre de copies par µg d'ADN en corrélant les valeurs de Ct aux nombres de copies obtenus à partir des courbes étalons (deux exemples illustratifs des résultats obtenus sont présentés dans les figures 15 et 16).

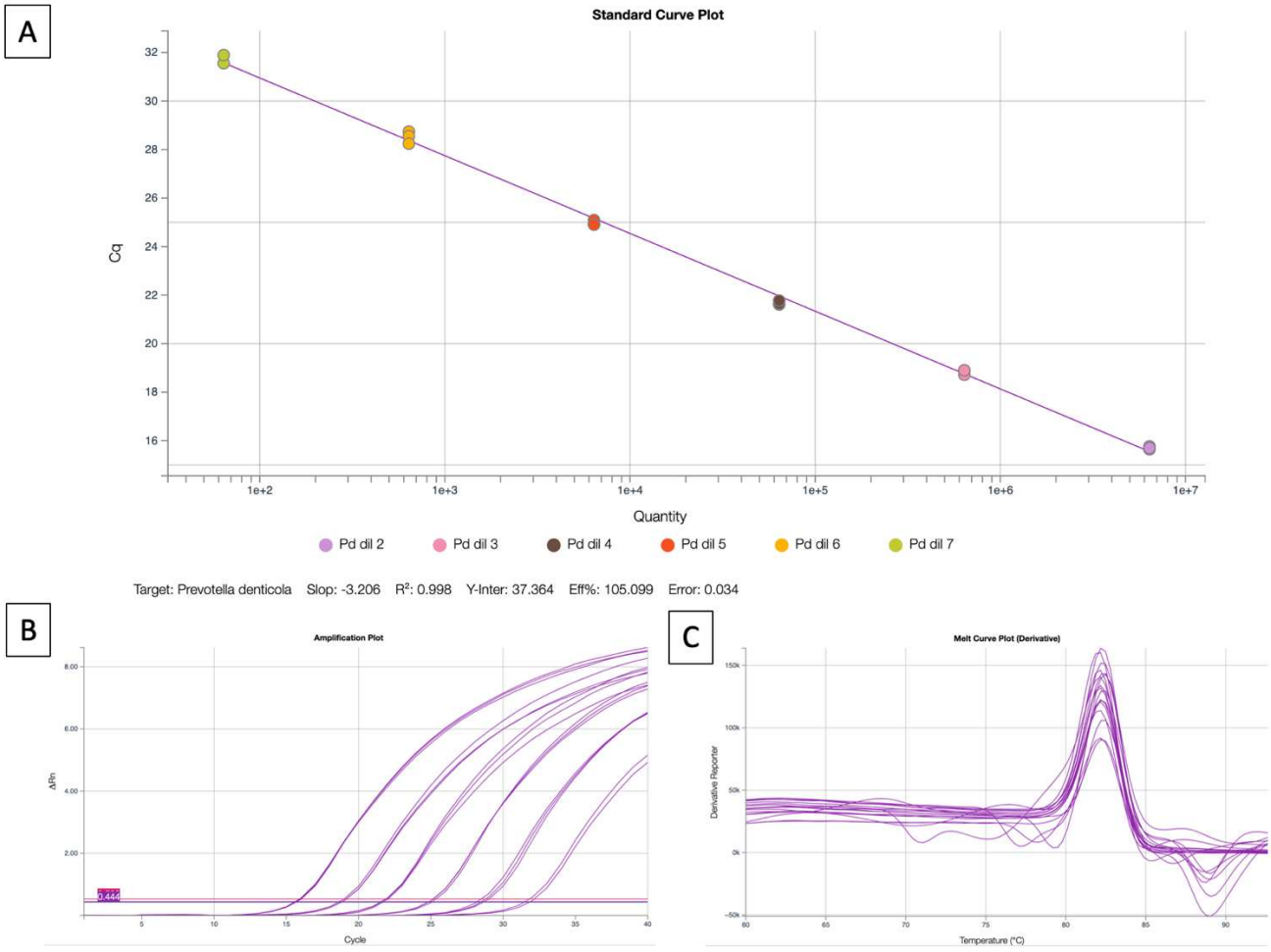


Figure 15 : Gamme étalon pour la quantification d'un gène spécifique (troA) de Prevotella denticola. A) Courbe étalon illustrant les valeurs de Ct obtenues en fonction des dilutions en série réalisées à partir de l'ADN étalon de P. denticola. B) Courbes d'amplification montrant l'évolution des valeurs Ct en fonction des différentes concentrations d'ADN étalon utilisé dans chaque essai. C) Courbes de dissociation (Melt curves) confirmant la spécificité du produit PCR amplifié. Chaque point PCR a été effectué en duplicata.

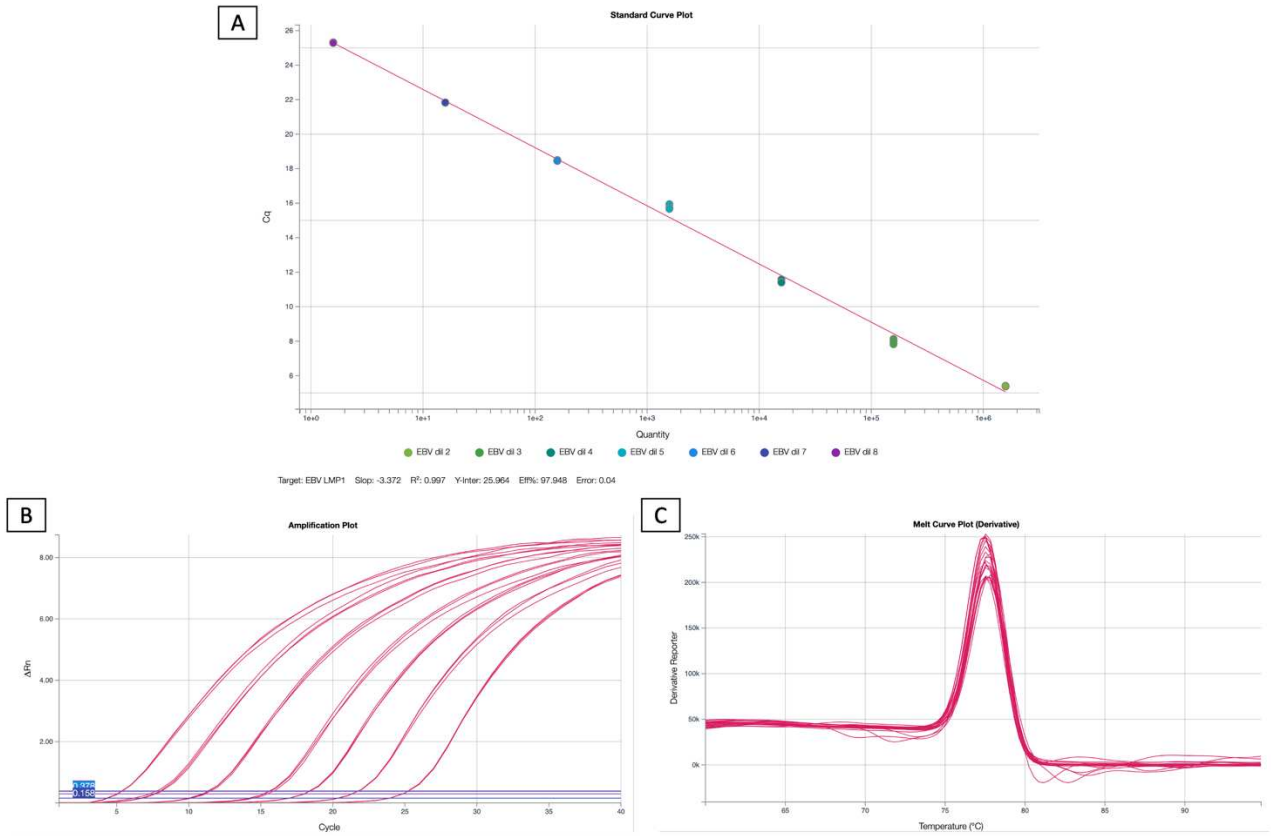


Figure 16 : Gamme étalon pour la quantification d'un gène spécifique (lmp1) de l'Epstein Barr virus (EBV).

A) Courbe étalon illustrant les valeurs de Ct obtenues en fonction des dilutions en série réalisées à partir de l'ADN étalon de EBV. B) Courbes d'amplification montrant l'évolution des valeurs Ct en fonction des différentes concentrations d'ADN étalon utilisé dans chaque essai. C) Courbes de dissociation (Melt curves) confirmant la spécificité du produit PCR amplifié. Chaque point PCR a été reproduit en duplicata.

Pour chaque courbe étalon, le coefficient de détermination (R^2) ainsi que l'efficacité de la qPCR ont été calculés (Tableau 4). L'ensemble des courbes étalons, utilisées pour quantifier les 48 cibles microbiennes, présente un R^2 supérieur à 0,96, ce qui indique une forte corrélation entre les valeurs de Ct obtenues et le nombre de copies par µg d'ADN. Ces résultats démontrent que la valeur Ct peut être utilisée pour prédire de manière fiable la quantité d'ADN présente dans nos échantillons. Cependant, l'analyse de l'efficacité de la qPCR révèle que certaines courbes nécessitent encore des ajustements. En effet, pour être considérée comme optimale, l'efficacité de la qPCR doit se situer entre 90 et 110%. Dans certains cas, les valeurs observées s'écartent de cet intervalle. Certaines bactéries orales étant assez difficiles à cultiver, nous pensons que certaines de ces variations d'efficacité pourraient provenir d'une concentration en ADN extraite de ces bactéries insuffisante, ce qui pourrait impacter la

performance de la réaction PCR. Pour se faire, nous envisageons de cultiver et d'extraire à nouveau l'ADN de ces espèces afin de tester ces réactions d'efficacité PCR. Nous avons également jugé pertinent d'examiner les limites de détection minimale des différentes espèces microbiennes ciblées à l'aide de la qPCR conventionnelle dont les résultats sont présentés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Paramètres de performance des courbes étalons en qPCR conventionnelle pour la détection des espèces microbiennes.

Ce tableau présente les espèces microbiennes ciblées, ainsi que les coefficients de détermination (R^2) associés à chaque courbe étalon, indiquant la précision de la méthode de qPCR. Les efficacités de la qPCR pour chaque espèce sont également présentées, offrant une précision sur la performance de la détection. Le tableau fournit également les seuils de détection minimale exprimées en nombre de copies par µL, établis par qPCR conventionnelle.

Espèces	**R^2**	**Efficacité (%)**	**Détection minimale (nombre de copies / µL)**
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	0,99	94,27	2,99E+02
Actinomyces massiliensis	1,00	110,15	1,26E+01
Actinomyces naeslundii	0,98	62,67	7,61E+03
Capnocytophaga gingivalis	0,99	115,50	2,56E+01
Corynebacterium matruchotii	0,97	87,392	1,84E+02
Centipeda periodontii	0,99	122,93	1,94E+00
Campylobacter rectus	0,98	139,48	1,67E+02
Dialister pneumosintes	0,99	88,14	1,54E+01
Eikenella corrodens	0,99	118,18	1,97E+01
Eubacterium nodatum	1,00	109,17	5,40E+01
Filifactor alocis	0,96	114,74	1,01E+01
Fusobacterium nucleatum	1,00	106,03	8,59E+00
Granulicatella adiacens	1,00	126,14	4,45E+00
Gemella haemolysans	0,99	78,23	3,35E+02
Haemophilus parainfluenzae	0,99	104,06	1,83E+01

Klebsiella pneumoniae	1,00	140,32	4,80E+00
Micrococcus luteus	1,00	118,81	4,07E+01
Megasphaera micronuciformis	1,00	94,30	1,29E+00
Pseudomonas aeruginosa	0,99	94,76	8,67E+01
Peptostreptococcus anaerobius	1,00	116	7,85E+00
Prevotella melaninogenica	1,00	88,33	9,90E+02
Parvimonas micra	1,00	97,83	4,60E+00
Prevotella denticola	1,00	106,00	4,73E+01
Porphyromonas endodontalis	0,99	81,53	2,14E+03
Porphyromonas gingivalis	0,99	120,55	1,99E+01
Prevotella intermedia	1,00	113,00	5,62E+00
Prevotella nigrescens	1,00	114,76	9,33E+00
Propionibacterium propionicum	1,00	103,14	4,26E+00
Rothia mucilaginosa	1,00	74,74	1,40E+03
Streptococcus salivarius	0,99	130,35	1,55E+01
Streptococcus sanguinis	0,99	99,23	1,15E+03
Selenomonas sputigena	0,99	87,95	1,48E+02
Streptococcus gordonii	1,00	59,347	1,88E+04
Streptococcus mutans	0,98	106,31	7,24E+00
Streptococcus oralis	0,99	111,16	1,30E+01
Treponema denticola	1,00	102,44	9,75E+00
Tannerella forsythia	1,00	91,67	1,25E+01
Veillonella parvula	1,00	124,17	6,25E+00
HSV-1	0,99	97,77	6,40E+00
HSV-2	1,00	73,49	2,14E+00
EBV	1,00	97,95	1,58E+00
CMV	1,00	93,62	4,14E+00
VZV	1,00	115,11	4,59E+01
HHV-6	0,99	105,61	1,65E+00
HHV-7	1,00	103,47	4,50E+00

HHV-8	1,00	133,64	1,41E+04

c. Validation sur la technologie du Biomark™ HD (en cours)

Afin de valider l'efficacité des amorces spécifiques et la performance de la PCR pour la détection des 8 HHV et des 38 bactéries avec la technologie du Biomark™ HD, nous avons analysé des dilutions sérielles d'un mélange des 48 ADN étalons ciblés dans notre panel. Ce contrôle positif est normalisé pour contenir 1 ng d'ADN de chaque cible dans le pool. Quelques courbes étalons illustratives sont présentées dans la Figure 17. Ces courbes, qui permettent la quantification des espèces bactériennes et virales spécifiques, sont globalement satisfaisantes, démontrant une bonne linéarité du système. Toutefois, certaines cibles ne présentent pas des résultats satisfaisants, notamment la détection du HHV-8, où seuls deux points de la gamme ont été détectés. L'optimisation de certaines PCR sur le Biomark™ HD s'avère donc encore nécessaire pour quelques cibles du panel.

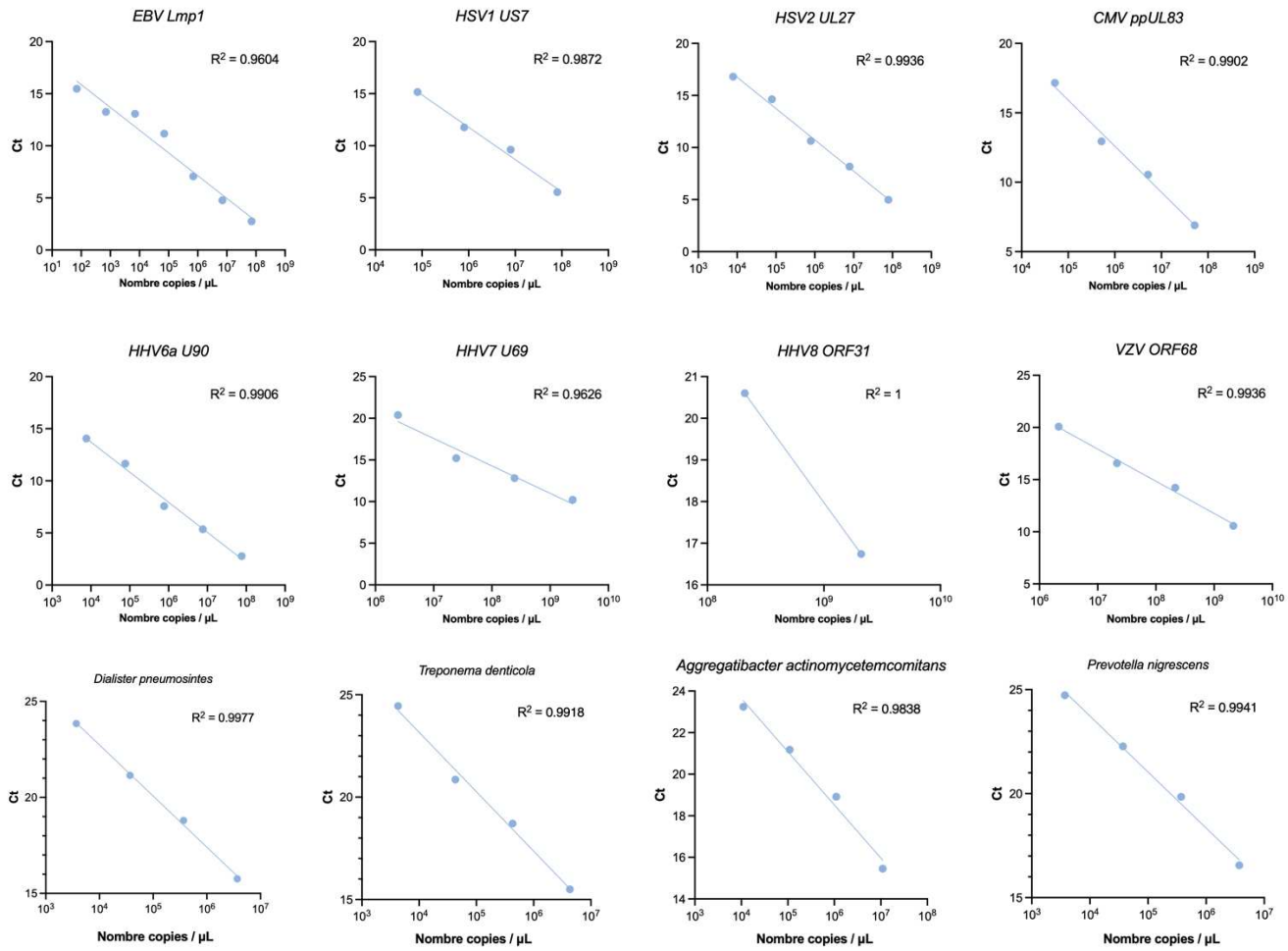


Figure 17 : Courbes étalons illustratives pour la quantification des gènes spécifiques des huit HHV et de quatre bactéries.

Les courbes étalons obtenues avec la technologie du Biomark™ HD montrent les valeurs de Ct obtenues en fonction des dilutions en série (exprimées en nombre de copies par µL) réalisées à partir de l'ADN étalon de chaque espèce microbienne.

Afin d'évaluer la reproductibilité et la répétabilité des résultats obtenus avec la technologie Biomark™ HD, nous avons comparé la détection des 48 cibles microbiennes du contrôle positif (mélange des 48 ADN étalons ciblés) au cours de 7 expériences indépendantes. La reproductibilité et la répétabilité des données obtenues, illustrée par un faible taux de variations des écarts-types est présentée dans la Figure 18. Ces résultats démontrent la robustesse et la fiabilité de la technologie Biomark™ HD pour la quantification des cibles génétiques.

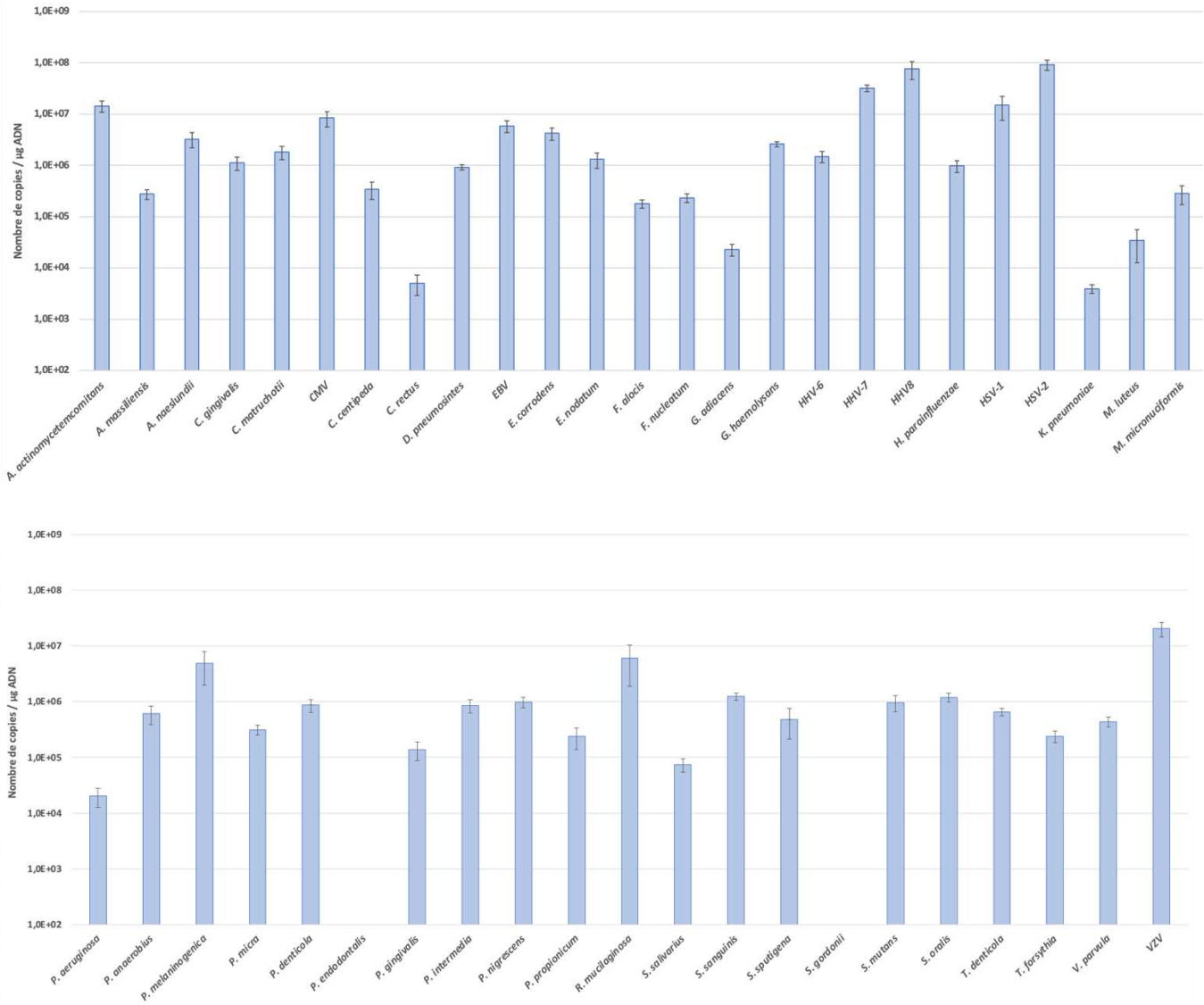


Figure 18 : Reproductibilité et répétabilité de la détection du contrôle positif sur la technologie du Biomark™ HD.

Le contrôle positif est constitué d'un mélange des ADN étalons des 38 bactéries et 8 HHV cibles, chacun normalisé à 1 ng dans ce mélange. La répétabilité et reproductibilité de cette détection a été réalisée sur 7 expériences indépendantes et les résultats sont exprimés en nombre de copies par µg d'ADN. Les histogrammes représentent pour chaque ADN étalon la moyenne de 7 expériences indépendantes ainsi que la variation autour de cette moyenne (écart-type).

III. Validation de l'array de détection et de quantification du microbiote oral par PCR microfluidique sur des prélèvements biologiques

Bien que certains aspects nécessitent encore des optimisations, les résultats obtenus avec la PCR conventionnelle et la technologie Biomark™ HD pour la détection des ADN étalons confirment, dans leur grande majorité, la spécificité des détections PCR des 48 cibles microbiennes sélectionnées ainsi que la faisabilité de l'approche Biomark pour la détection simultanée de ces cibles. À ce stade du projet, nous avons souhaité renforcer ces étapes de validation en utilisant des échantillons biologiques. A cet effet, une série de prélèvements salivaires et de frottis gingivaux issus de 122 donneurs présentant différents états de santé bucco-dentaire a été constitué.

Dans un premier, nous avons souhaité mener une étude comparant l'efficacité des deux méthodes (PCR conventionnelle et Biomark™ HD) sur 24 prélèvements salivaires et uniquement 16 cibles bactériennes et les 8 HHV. Dans un second temps, la technologie Biomark™ HD a été testé pour analyser la présence des 48 cibles microbiennes dans les salives et les frottis en fonction de la santé bucco-dentaire des donneurs.

1. Matériels et méthodes de l'étude

a. Conception de l'étude et critères d'inclusion

L'objectif de ce projet était de collecter des échantillons de salives ainsi que des frottis gingivaux (écouvillons) dans la cavité orale d'individus volontaires et de classer ces prélèvements en fonction de la santé bucco-dentaire des donneurs en 4 groupes : Sains, atteints de caries, atteints de maladies parodontales, atteints à la fois de caries et de maladies parodontales. Pour classer les participants, nous avons utilisé les critères suivants : la présence d'une carie active suffisait pour être classé dans le groupe « Caries ». La présence d'une inflammation gingivale ou d'une mobilité dentaire classait les patients dans le groupe « Maladies parodontales » (ce groupe inclut à la fois la gingivite et la parodontite). Le

groupe « Caries & Maladies Parodontales » inclut les patients ayant au moins une carie active et la présence d'une inflammation gingivale ou d'une mobilité dentaire. Le groupe « Sains » inclut les patients sans caries actives, sans inflammation gingivale, sans mobilité dentaire et sans infections (telles que des abcès, des fistules ou des fragments dentaires disloqués).

Dans le cadre de cette étude, nous avons recrutés 122 patients, répartis en 4 groupes :

1. Sains (n= 43)
2. Caries (n= 24)
3. Maladies parodontales (n= 29)
4. Caries & Maladies parodontales (n= 26)

b. Recrutement des donneurs

Les participants inclus dans l'étude étaient en consultation pour des soins dentaires à l'Institut bucco-dentaire du CHU de Nice. Les individus ayant accepté de participer à l'étude ont reçu des informations écrites sur le protocole de l'étude et ont signé une lettre de non-opposition. Des informations générales, telles que l'âge, le sexe, les antécédents médicaux et les habitudes tabagiques, ont été recueillis pour chaque participant. Le critère de non-inclusion était la prise d'antibiotiques dans les 3 semaines avant le rendez-vous chez le dentiste. Les critères d'inclusion comprenaient l'acceptation d'effectuer un examen bucco-dentaire, de réaliser deux prélèvements salivaires effectués par le dentiste, et de signer le formulaire de consentement acceptant la réalisation d'analyses biologiques sur les échantillons salivaires.

c. L'examen bucco-dentaire

Les caries dentaires ont été diagnostiquées selon l'indice DMF (5ème édition, Genève). L'état parodontal a été réalisé en fonction des analyses de l'indice de Loe et Sillness (LSI), de l'indice de plaque (PI), de l'indice de Muhlmann et de l'indice de Miller pour les récessions. Ces paramètres renseignent sur la présence d'inflammations gingivales associées à des maladies parodontales (comprenant la gingivite et la parodontite). L'examen buccal comprenait également le nombre de dents manquantes, la présence de résidus radiculaires, les infections, ainsi que l'usure dentaire avec l'indice d'usure des dents (TWI). Deux dentistes diplômés ont réalisé les examens de santé bucco-dentaire et les prélèvements. Avant l'examen, une calibration entre les deux dentistes a été effectuée pour s'accorder sur les critères d'évaluation.

d. Prélèvements bucco-dentaires et extraction d'ADN

Avant l'échantillonnage, il a été demandé aux participants de se rincer la bouche avec de l'eau stérile pendant une minute. Afin de minimiser les interférences, il leur a été demandé de ne pas boire, manger, fumer, ou se brosser les dents 30 minutes avant les prélèvements.

La salive non stimulée (1 mL) des 122 patients a été recueillie dans des tubes stériles, puis conservée à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. De plus, un frottis de la jonction entre les dents et la gencive sur la mandibule a été réalisé pendant 30 secondes avec un coton tige (Dutscher, ref 020467A), avant d'être également stocké à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. L'écouvillonnage n'a pas pu être effectué sur l'ensemble de la cohorte, et uniquement 79 individus ont été concernés (Sains = 30 ; Caries = 16 ; Maladies parodontales = 18 ; Maladies parodontales & Caries = 15).

L'ADN a été extrait de la salive non stimulée des 122 patients en utilisant le QIAamp DNA Blood Midi Kit® (Qiagen), selon les recommandations techniques fournies par le fabricant. Pour l'extraction d'ADN à partir des 79 écouvillons, nous avons utilisé le QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen), en suivant les instructions du protocole « DNA purification from Buccal swabs », avec une modification mineure. Plus précisément, après avoir placé l'écouvillon dans du tampon PBS, une étape supplémentaire de sonication pendant 10 minutes a été ajoutée, suivie d'une agitation violente par vortex pendant une minute. Cette étape améliore nettement la récupération de l'ADN adhérent à l'écouvillon.

La quantification des ADN extraits a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à microvolume (Nanodrop Lite Plus™).

e. Quantification des échantillons par qPCR conventionnelle et Biomark™ HD

Le contrôle positif utilisé consiste en un mélange des ADN étalons des 38 bactéries et des 8 HHV, avec exactement 1 ng d'ADN ajouté pour chaque espèce dans ce mélange. Le contrôle négatif est de l'eau de qualité utilisée pour la biologie moléculaire (sans nucléases). Les ADN extraits des échantillons de salive ont été individuellement normalisés à 10 ng/µL, tandis que ceux issus des écouvillons ont été normalisés à 1 ng/µL pour optimiser les conditions expérimentales. L'entièreté de la procédure, à savoir l'extraction d'ADN ainsi que les réactions PCR, est validée via la détection de deux gènes endogènes humains toujours présents dans les prélèvements, la *Gapdh* et *Rpl0*.

Concernant les expériences réalisées avec la technologie Biomark™ HD, 1,25 µL de chaque échantillon a été utilisé, correspondant à 12,5 ng d'ADN pour les échantillons de salive et 1,25 ng d'ADN pour les échantillons d'écouvillons. Les analyses ont été effectuées en utilisant des plaques

IFC 96.96, conformément aux instructions de Standard Biotools, en suivant le protocole « Preamplification of cDNA for Gene Expression with Delta Gene assays ».

La pré-amplification est une étape qui permet d'amplifier tous les ADN cibles présents dans l'échantillon. Cette étape est nécessaire pour augmenter la sensibilité et l'efficacité de la PCR Biomark^{TM} HD (Olwagen, Adrian, and Madhi 2019). Cette pré-amplification a été réalisée sous les conditions suivantes : 95°C pendant 2 min ; (95°C pendant 15s ; 60°C pendant 2 min) pendant 10 cycles. Le mélange réactionnel est ensuite traité par l'exonucléase I qui dégrade tous les ADN simple brin résiduels. Le mélange réactionnel, dilué au 1/20ème est ensuite traité conformément au protocole « Gene expression with the 96.96 IFC using Delta Gene assays on preamplified samples » en utilisant le Mix AX Sso Fast EvaGreen Supermix with low ROX (BioRad, 172-5211) pour quantifier le microbiote oral. Chaque échantillon est analysé en quadruplicata (duplicata d'amorces (tableau 3) et duplicata d'échantillons). Les résultats finaux ont été normalisés à l'aide des courbes étalons comme illustrée en Figure 15 et 16, et exprimés en nombre de copies par µg d'ADN.

Pour la qPCR conventionnelle, 2 µL de chaque échantillon ont été utilisés, équivalent à 20 ng d'ADN pour les échantillons de salive et 2,0 ng d'ADN pour les échantillons d'écouvillon. La détection des gènes bactériens et viraux a été effectuée à l'aide du Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, USA). Les expériences de PCR ont été réalisées avec le système QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™) dans un volume final de 20 µL. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 95°C pendant 10 s ; (95°C pendant 15 s ; 60°C pendant 1 min) pendant 40 cycles. Chaque échantillon a été analysé en duplicata en utilisant les amorces spécifiques (Tableau 3). Les résultats finaux ont été normalisés en fonction des courbes étalons et exprimés en nombre de copies par µg d'ADN.

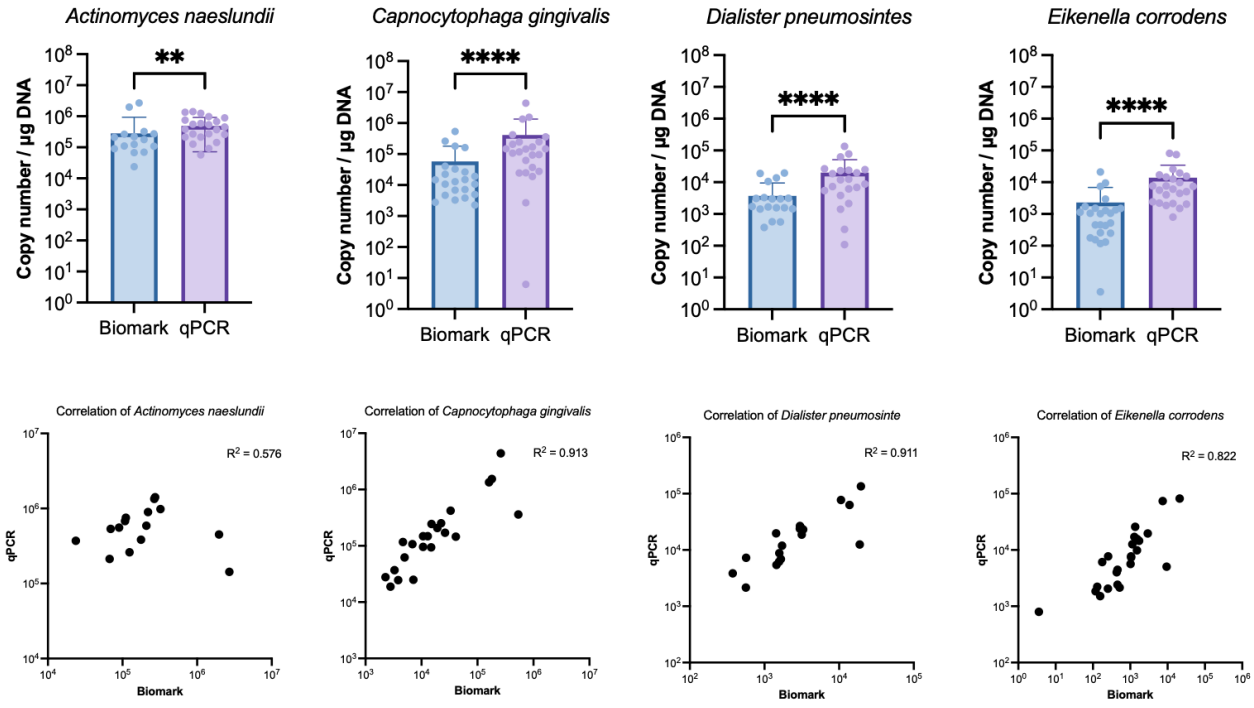
f. Analyses statistiques

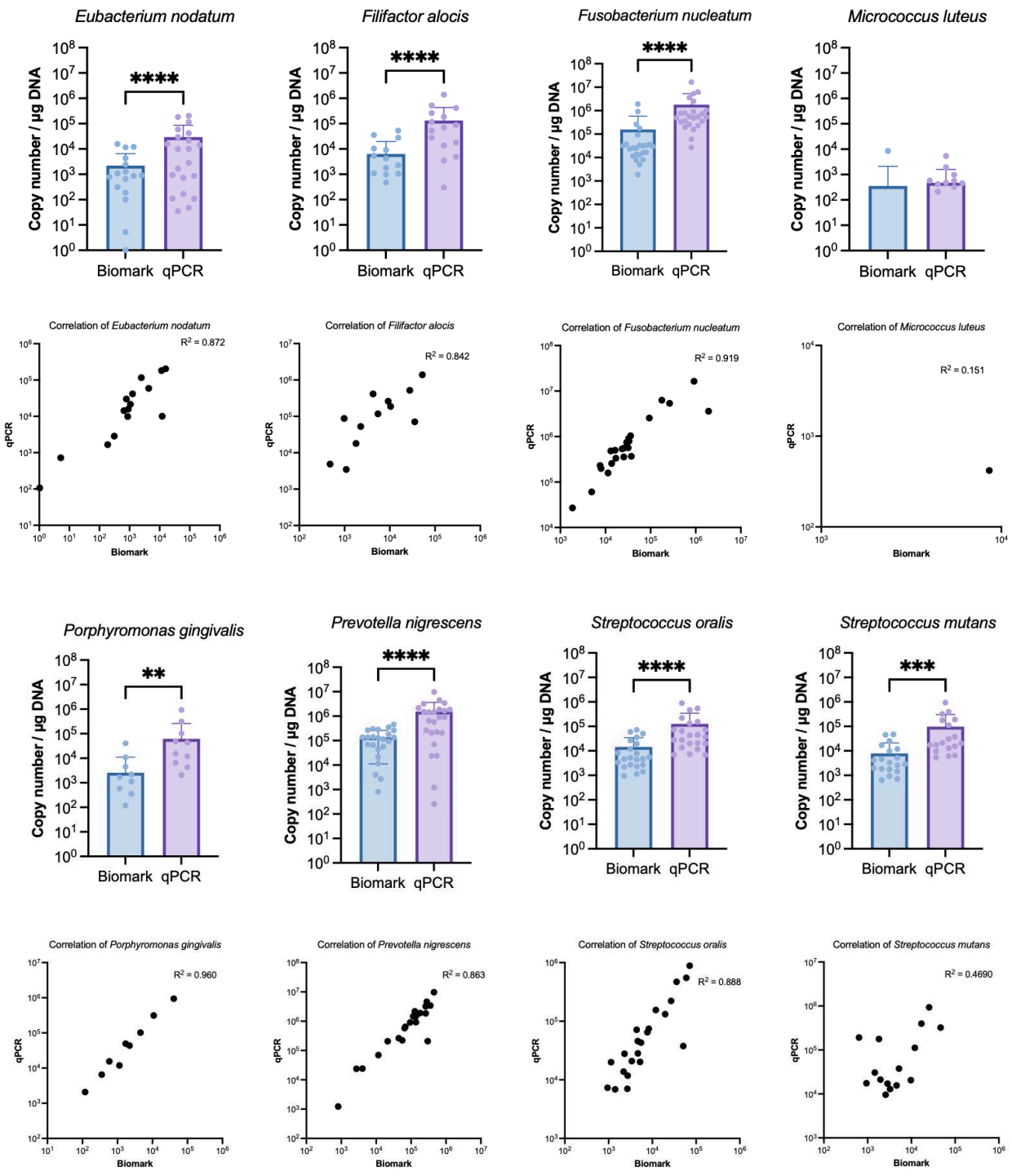
Lorsque les données suivaient une distribution normale, les comparaisons de moyennes ont été réalisées à l'aide du test t paramétrique (apparié ou non apparié). En revanche, si les données ne suivaient pas une distribution normale, les comparaisons de moyennes ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique de Wilcoxon (apparié ou non apparié). Pour les comparaisons impliquant plus de deux groupes, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé. Les analyses de corrélation ont, quant à elles, été réalisées à l'aide du coefficient de corrélation de Spearman. Les significativités des p-values utilisées par le logiciel Prism sont les suivantes : 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

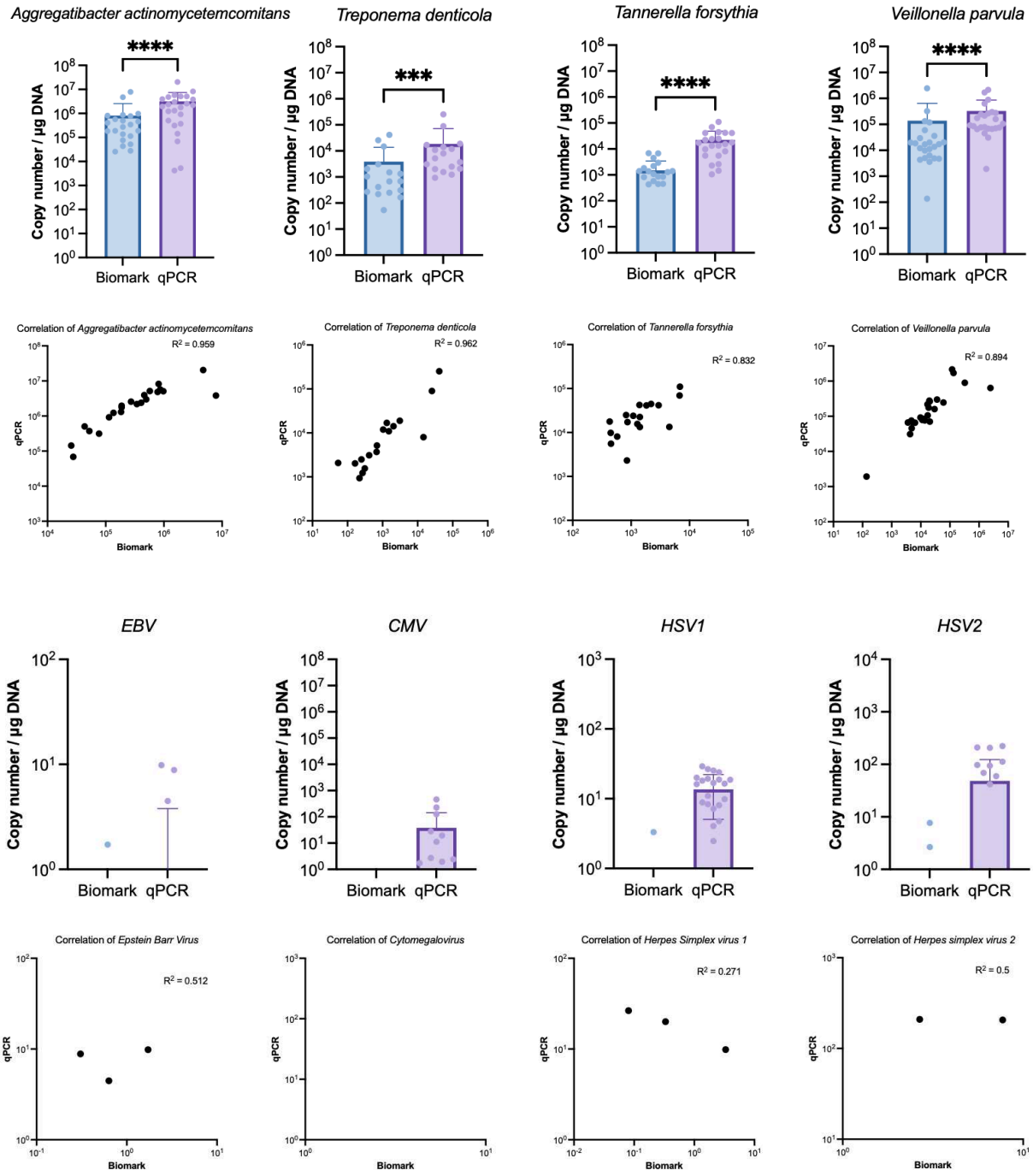
2. Résultats préliminaires de l'étude

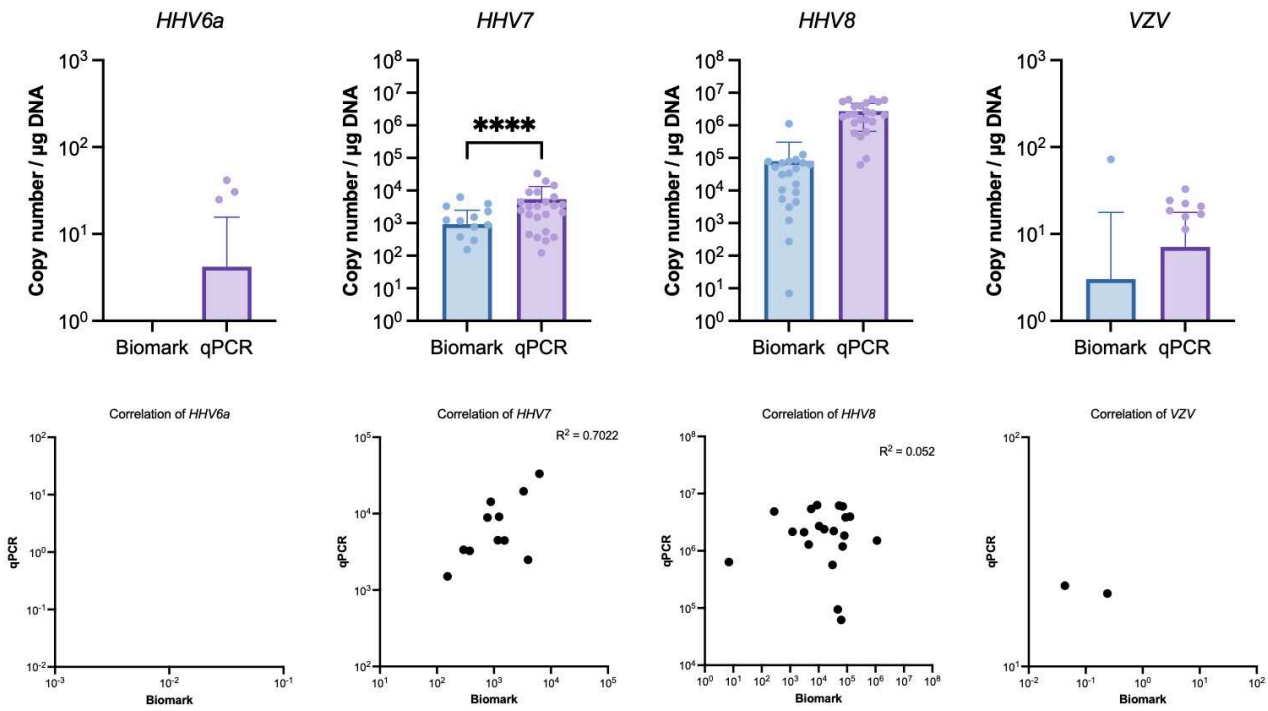
a. Comparaison entre la qPCR conventionnelle et le Biomark™ HD

Afin de comparer les deux technologies, à savoir la qPCR conventionnelle et le Biomark™ HD, nous avons comparé les résultats générés par chaque méthode concernant la quantification de 16 bactéries orales et des 8 HHV du microbiote oral, et cela dans 24 salives différentes. Les résultats sont présentés dans la Figure 19.




Eubacterium nodatum
Filifactor alocis
Fusobacterium nucleatum
Micrococcus luteus
Copy number / µg DNA
Biomark qPCR
****
Correlation of Eubacterium nodatum
R² = 0.872
Correlation of Filifactor alocis
R² = 0.842
Correlation of Fusobacterium nucleatum
R² = 0.919
Correlation of Micrococcus luteus
R² = 0.151
qPCR
Biomark
Porphyromonas gingivalis
Prevotella nigrescens
Streptococcus oralis
Streptococcus mutans
**
***
Correlation of Porphyromonas gingivalis
R² = 0.960
Correlation of Prevotella nigrescens
R² = 0.863
Correlation of Streptococcus oralis
R² = 0.888
Correlation of Streptococcus mutans
R² = 0.4690


Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Treponema denticola
Tannerella forsythia
Veillonella parvula
Copy number / µg DNA
Biomark qPCR
****
***
****
****
Correlation of Aggregatibacter actinomycetemcomitans
R² = 0.959
Correlation of Treponema denticola
R² = 0.962
Correlation of Tannerella forsythia
R² = 0.832
Correlation of Veillonella parvula
R² = 0.894
qPCR
Biomark
EBV
CMV
HSV1
HSV2
Correlation of Epstein Barr Virus
R² = 0.512
Correlation of Cytomegalovirus
Correlation of Herpes Simplex virus 1
R² = 0.271
Correlation of Herpes simplex virus 2
R² = 0.5



<u>Figure 19 : Comparaison des performances de détection du Biomark™ HD et de la qPCR conventionnelle pour les espèces bactériennes et virales dans des échantillons salivaires.</u>
Comparaison du nombre de copies par µg d'ADN mesuré via les deux technologies pour 16 espèces bactériennes et 8 virales dans 24 échantillons salivaires. Les histogrammes indiquent la valeur moyenne de 24 mesures effectuées ainsi que les écarts-types. Le test de Wilcoxon pour données appariées permet de comparer les deux groupes de données obtenues (n= 24) pour chaque technologie pour chaque cible microbienne. De plus, une analyse de corrélation de Spearman a été effectuée afin d'évaluer la concordance entre les deux technologies (valeur R^2). Les significativités des p-values utilisées par le logiciel Prism sont les suivantes : 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

La comparaison des mesures d'abondance des 16 espèces bactériennes testées sur 24 salives (Figure 19) par les deux technologies présente des résultats globalement assez bien corrélés. En effet, les coefficients de Spearman indiquent de fortes corrélations pour au moins 13 bactéries ($R^2 > 0.85$). Toutefois, des améliorations sont encore nécessaires pour certaines espèces, notamment *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans* et *Micrococcus luteus*, cette dernière étant très mal détectée avec la technologie du Biomark™ HD.

Les résultats présentés dans la Figure 19 mettent également en évidence des valeurs significativement plus élevées pour toutes les bactéries (à part *M. luteus)* lorsque la quantification est effectuée avec la PCR conventionnelle. En effet, la comparaison quantitative est en défaveur de la technologie du

Biomark™ HD qui donne des valeurs globalement inférieures en moyenne par rapport aux valeurs mesurées par PCR conventionnelle. Compte tenu des paramètres d'efficacité de la PCR conventionnelle, nous avons tendance à considérer que les PCR effectuées sur la technologie Biomark™ HD nécessite sans doute encore des ajustements pour donner des valeurs plus élevées. Dans ce contexte, une voie d'optimisation concerne le nombre de cycles de pré-amplification qui est effectué en amont des étapes de PCR individuelles sur la technologie Biomark™ HD. Actuellement, nous effectuons 10 cycles de pré-amplification, un ajustement de 1 ou 2 cycles supplémentaires pourraient éventuellement augmenter la sensibilité de la technique.

La détection des HHV salivaires par la technologie Biomark™ HD est limitée par leur présence généralement faible et variable chez des individus en bonne santé. Comme pour les résultats obtenus avec les bactéries, la PCR conventionnelle donne des résultats supérieurs, mais qui concernent de faibles quantités de génomes par microgramme d'ADN salivaire (de quelques unités à quelques centaines). Seul HHV-7, bien que la corrélation puisse encore être optimisée, présente des résultats cohérents entre les deux technologies, malgré la différence significative présente entre les deux moyennes. En revanche, pour les autres virus, la détection avec la technologie du Biomark™ HD dans les salives est faible voire inexistante, malgré le fait que la technologie soit capable de détecter les ADN viraux étalons (Figure 17).

Les résultats HHV-8 ne sont pas cohérents dans la mesure où nous détectons HHV-8 dans 83% des échantillons (20/24) alors que, selon les données épidémiologiques (site des Maladies infectieuses et Tropicales, ePOPI), la prévalence de HHV-8 en Europe varie généralement entre 4 et 20%. La littérature ne fournit pas de références spécifiques concernant la quantité de HHV-8 dans la salive. Le rationnel justifiant d'inclure HHV-8 dans le panel d'étude oral était notamment de pouvoir disposer d'un signal faible ou le plus souvent négatif concernant cette cible.

Les validations en cours, qui concernent la détection des HHV par Biomark™ HD, consistent notamment à mesurer la quantité des génomes des différents HHV dans les échantillons étudiés avec une technique de PCR standardisée, commercialisée et utilisée en routine dans de nombreux laboratoires de virologie médicale (Kits AltoStar, ref : AS0881503). La comparaison des résultats permettra de comparer ces données avec les données que nous obtenons par PCR conventionnelle et par Biomark™ HD.

b. Utilisation de la technologie Biomark™ HD pour analyser la présence des 48 espèces microbiennes orales dans la salive, en fonction de la santé bucco-dentaire

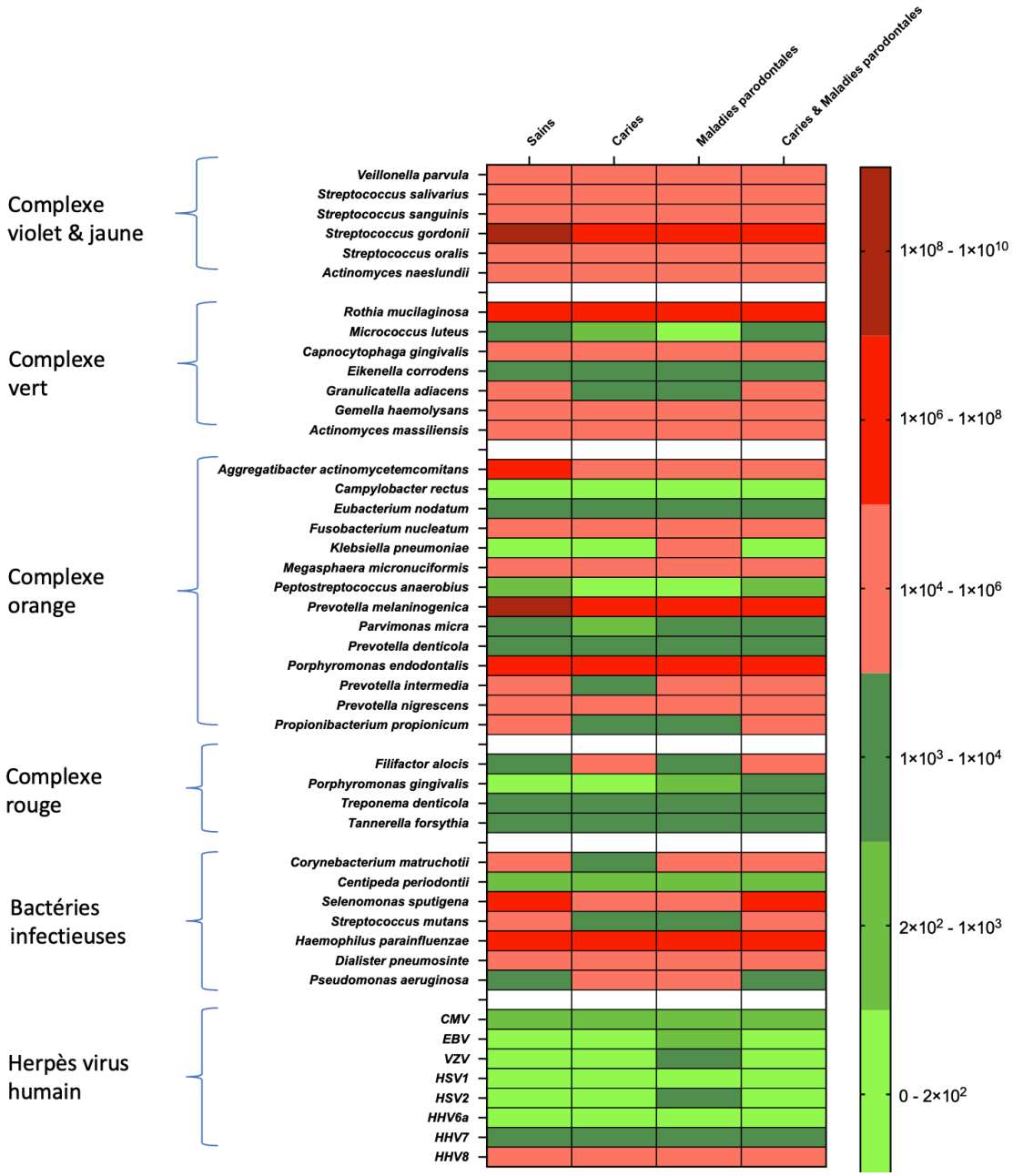


Figure 20 : Répartition des populations bactériennes et virales dans les échantillons salivaires selon l'état de santé bucco-dentaire.

Heatmap des quantifications des populations bactériennes et virales, exprimées en nombre de copies par µg d'ADN, dans les échantillons salivaires selon les différents états de santé bucco-dentaire : Sains (n=43), Caries (n=24), Maladies parodontales (n=29), Caries & Maladies parodontales (n=26). Les espèces bactériennes sont classées par complexe selon la classification de Socransky.

La Figure 20 présente la distribution quantitative des bactéries selon l'état de santé bucco-dentaire des 92

4 groupes étudiés. On observe que les bactéries appartenant aux complexes violet et jaune de Socransky, notamment *Streptococcus gordonii*, sont abondamment présentes, indépendamment de la santé bucco-dentaire. Ces bactéries, connues comme étant les premiers colonisateurs des surfaces dentaires, incluent également des espèces du complexe vert.

A l'exception de *Micrococcus luteus* et *Eikenella corrodens*, présentes en faibles quantités, les autres bactéries du complexe vert, notamment *Rothia mucilaginosa* sont retrouvées en abondance. Ces résultats renforcent l'idée que ces bactéries jouent un rôle crucial dans les premières phases de la formation du biofilm oral, que ce soit en contexte de santé ou de pathologie buccale.

Le complexe orange, qui regroupe les colonisateurs secondaires du biofilm oral, présente une certaine hétérogénéité dans les quantités selon les espèces. Par exemple, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus anaerobius* et *Klebsiella pneumoniae* sont peu présentes, tandis que *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas endodontalis* ou encore, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens* et *Megasphaera micronuciformis* sont plus abondantes. Cependant, la heatmap ne révèle pas de différences significatives entre les individus sains et ceux atteints de caries ou de maladies parodontales.

Les bactéries du complexe rouge de Socransky sont globalement présentes en assez faibles quantités, mais la heatmap montre quelques variations en fonction de l'état de santé bucco-dentaire. En effet, la bactérie *Porphyromonas gingivalis* tend à augmenter lorsque la santé bucco-dentaire se dégrade. De même, *Filifactor alocis* est plus abondante en cas de caries ou lors de l'association des maladies parodontales et carieuses. En revanche, les quantités de *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia* semblent rester stables, indépendamment de l'état de santé bucco-dentaire.

La plupart des espèces du groupe des « bactéries infectieuses », à l'exception de *Centipeda periodontii*, sont présentes en quantités élevées. Bien qu'une certaine hétérogénéité soit observée, aucune relation directe avec l'état de santé bucco-dentaire des patients n'est établie.

Concernant les HHV, le HHV-8 est détecté en quantité élevée dans les 4 groupes analysés. Toutefois, comme dit précédent dans la section « Comparaison entre la qPCR et le Biomark™ HD », ces résultats doivent être interprétés avec prudence. Enfin, bien que les autres HHV soient présents en faibles quantités, une légère augmentation du *Cytomegalovirus* (CMV) et de HHV-7 est observée. De plus, les virus EBV, VZV et HSV-2 montrent une légère augmentation en présence de maladie parodontale.

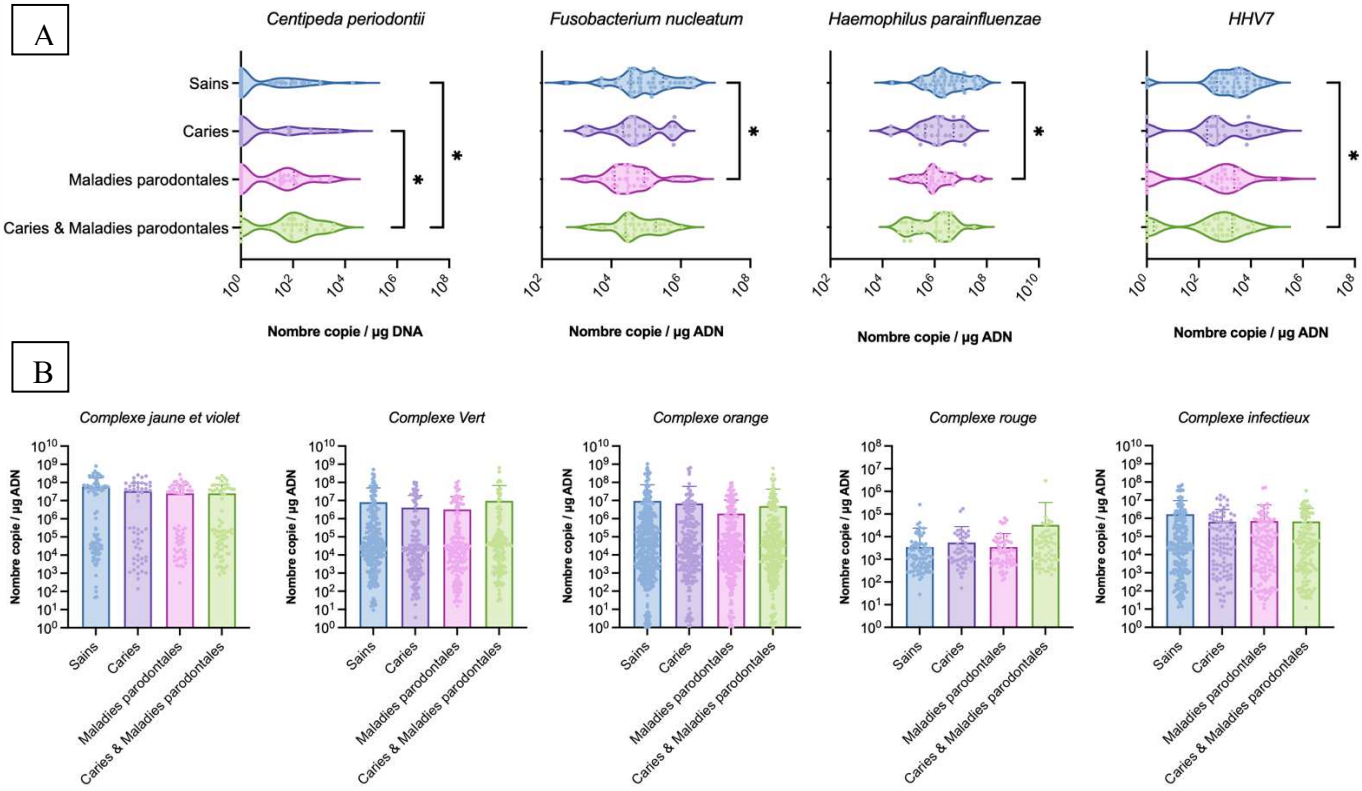


Figure 21 : Analyse des variations du microbiote oral dans les échantillons de crachats salivaires selon les états de santé bucco-dentaire.

(A) Espèces microbiennes dont la présence (en nombre de copies par µg d'ADN) est significativement différente dans les salives selon les états de santé bucco-dentaire : Sains (n=43), Caries (n=24), Maladies parodontales (n=29), Caries & Maladies parodontales (n=26). (B) Analyse des abondances microbiennes en fonction des complexes de Socransky et des bactéries infectieuses. Les comparaisons de moyennes intergroupes ont été réalisées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Chaque mesure représente la moyenne technique d'un quadruplicata expérimental. Les significativités des p-values utilisées par le logiciel Prism sont les suivantes : 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

Dans la Figure 21A, les comparaisons des moyennes effectuées à l'aide du test de Kruskal-Wallis révèlent des différences statistiquement significatives entre les salives des groupes de patients sains et ceux souffrant de maladies parodontales pour les bactéries *Fusobacterium nucleatum* et *Haemophilus influenzae*. De plus, le HHV-7 et la bactérie *Centipeda periodontii* présentent également des différences significatives de leurs moyennes entre le groupe de patients sains et le groupe de patients atteints à la fois de maladies parodontales et de caries. Il est également intéressant de noter qu'une différence a été observée pour *C. periodontii* entre le groupe de patients atteints uniquement de caries et celui de patients souffrant à la fois de caries et de maladies parodontales.

La Figure 21B fournit des informations complémentaires sur la quantité des différents complexes bactériens en fonction des états de santé bucco-dentaires, bien que les différences ne soient pas statistiquement significatives. Les histogrammes de cette figure confirment les résultats observés dans la Heatmap de la Figure 20, illustrant que, bien que les différents complexes bactériens soient présents en grandes quantités, le complexe rouge est relativement en moins abondant par rapport aux autres complexes.

c. Utilisation de la technologie Biomark™ HD pour analyser la présence des 48 espèces microbiennes orales dans les frottis gingivaux, en fonction de la santé bucco-dentaire

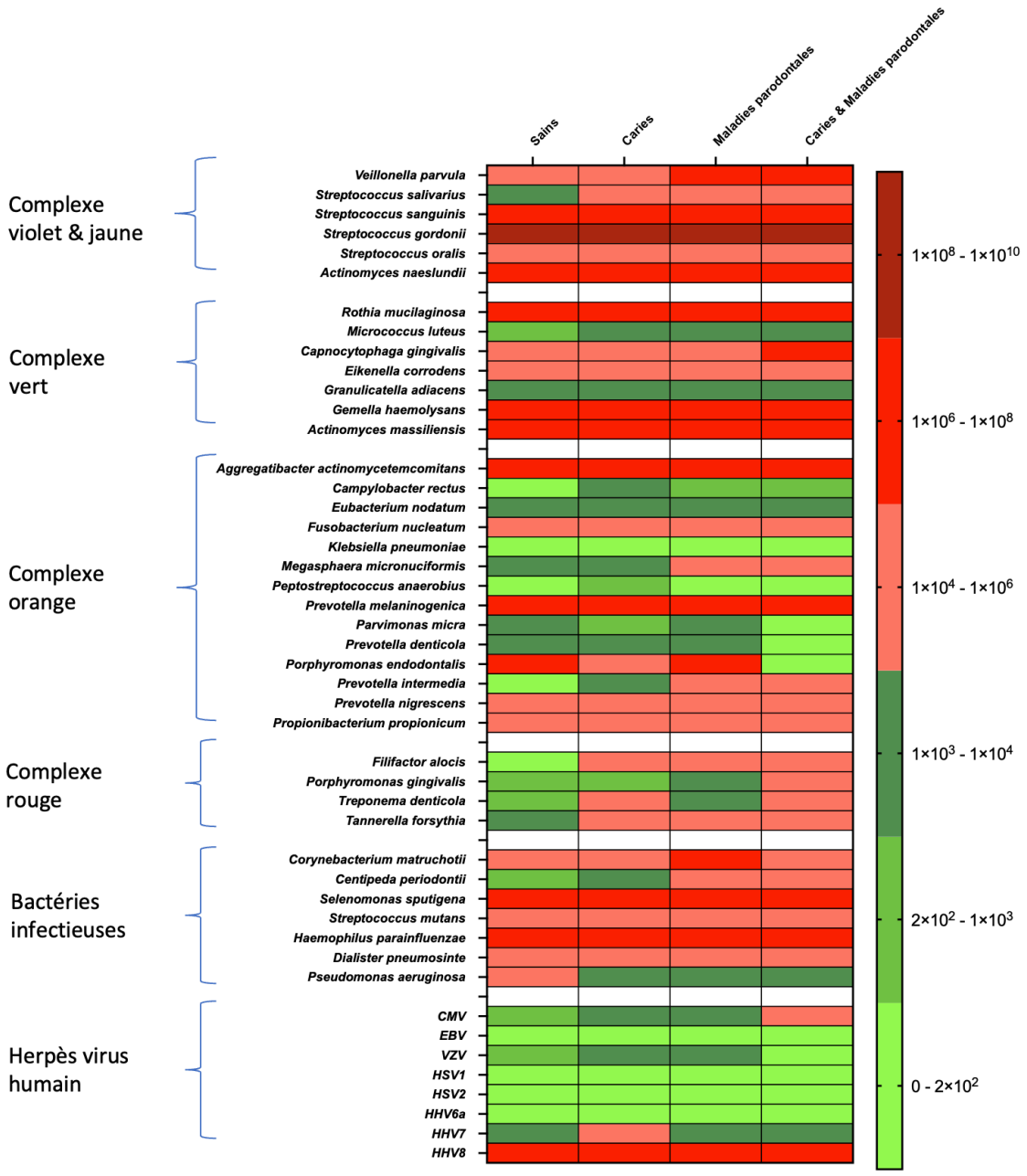


Figure 22 : Répartition des populations bactériennes et virales dans les écouvillons gingivaux selon l'état de santé bucco-dentaire.

Heatmap des quantifications des populations bactériennes et virales, exprimées en nombre de copies par µg d'ADN, dans les écouvillons gingivaux selon les différents états de santé bucco-dentaire : Sains (n=30), Caries (n=16), Maladies parodontales (n=18), Caries & Maladies parodontales (n=15). Les espèces bactériennes ont été classées selon la théorie de Socransky.

L'analyse de la heatmap de la Figure 22, qui présente l'abondance bactérienne et virale du microbiote

oral présent dans les écouvillons, conduit à établir plusieurs observations :

Les bactéries appartenant aux complexes jaune, violet et vert, telles que *Streptocococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii* et *massiliensis*, *Rothia mucilaginosa* et *Gemella haemolysans,* se trouvent en fortes quantités. Leur abondance reste globalement stable, indépendamment de l'état de santé bucco-dentaire des patients, à l'exception notable de *Veillonella parvula* et *Streptococcus salivarius,* dont la concentration augmente lorsque la santé bucco-dentaire se détériore.

L'abondance des bactéries du complexe orange, en revanche, est plus variable. Mis à part *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Prevotella melaninogenica,* présentes en grande quantité quel que soit l'état de santé bucco-dentaire, les autres bactéries de ce complexe sont moins abondantes. Toutefois, on observe une légère augmentation de *Megasphaera micronuciformis* en présence de maladies parodontales ou lorsqu'elles sont associées à des caries dentaires.

Une observation marquante concerne les bactéries du complexe rouge : elles sont faiblement présentes chez les patients en bonne santé et leur concentration augmente, à différents degrés, en cas de pathologie orale.

Les bactéries potentiellement infectieuses, notamment *Selenomonas sputigena* et *Haemophilus parainfluenzae,* sont abondantes. Néanmoins, l'état de santé bucco-dentaire semble peu influencer leur quantité, à l'exception de *Centipeda periodontii* et *Pseudomonas aeruginosa*, dont les variations sont plus notables.

En ce qui concerne les HHV, leur présence dans les écouvillons gingivaux est généralement faible, hormis le HHV-8, bien que ces résultats doivent être interprétés avec précaution. Le HHV-7 apparait légèrement plus fréquent chez les patients souffrant de caries, alors que le virus CMV montre une tendance à l'augmentation lorsque l'état de santé bucco-dentaire se dégrade.

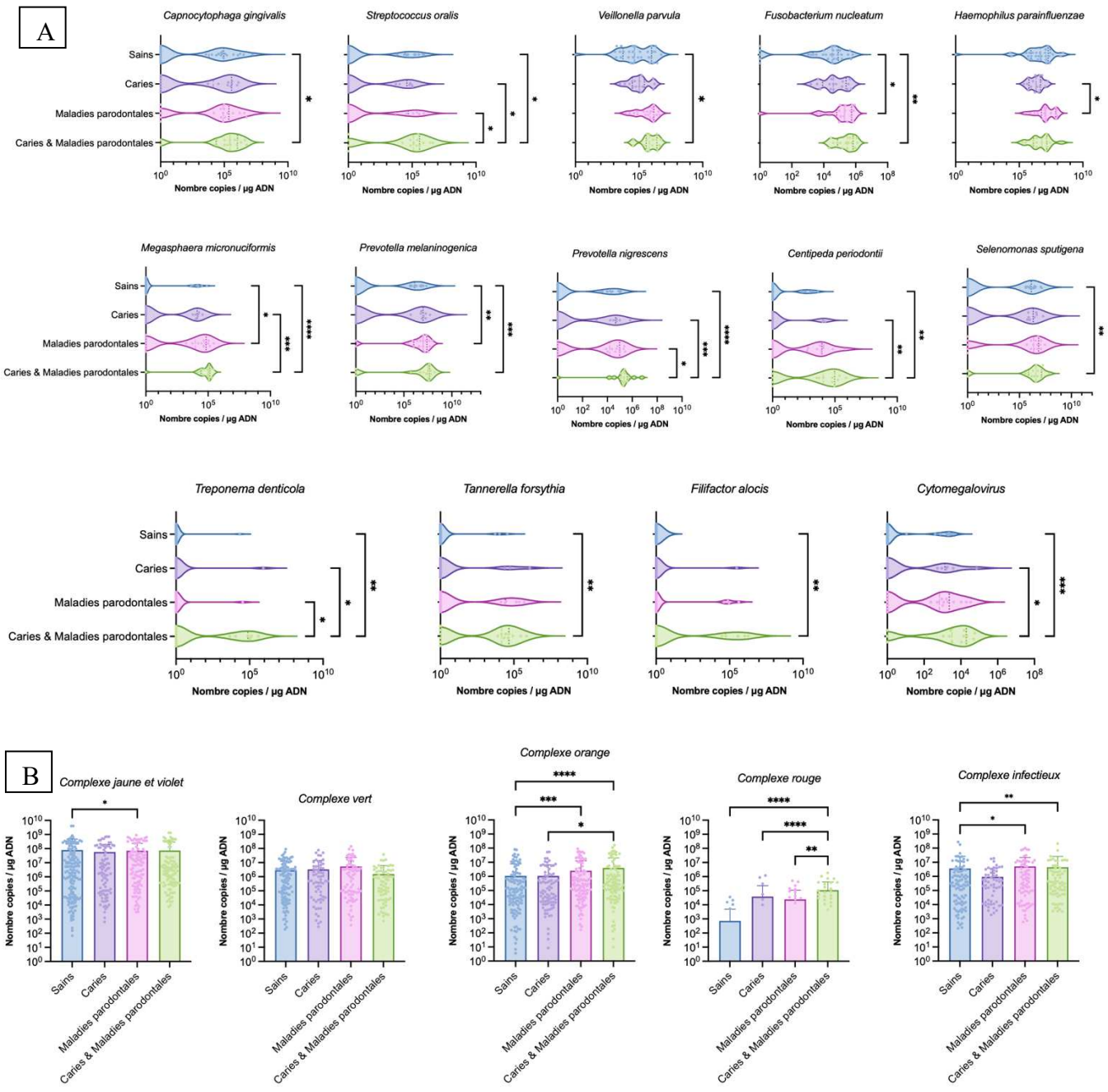


Figure 23 : Analyse des variations du microbiote oral dans les écouvillons gingivaux selon les états de santé bucco-dentaire.

(A) Espèces microbiennes dont la présence (en nombre de copies par µg d'ADN) est significativement différente dans les frottis gingivaux de groupes d'individus en lien avec les états de santé bucco-dentaire : Sains (n=30), Caries (n=16), Maladies parodontales (n=18), Caries & Maladies parodontales (n=15). (B) Analyse des abondances microbiennes en fonction des complexes de Socransky et des bactéries infectieuses. Les comparaisons de moyennes intergroupes ont été réalisées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Chaque mesure représente la moyenne technique

d'un quadruplicata expérimental. Les significativités des p-values utilisées par le logiciel Prism sont les suivantes : 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

On peut observer dans la Figure 23 que, *Capnocytophaga gingivalis*, qui est une bactérie appartenant au complexe vert de Socransky, est retrouvée en plus grande quantité dans le groupe de patients sains, ce qui est cohérent avec son association au microbiote oral commensal. En revanche, *Veillonella parvula* et *Streptococcus oralis*, appartenant respectivement aux complexes violet et jaune, montrent une augmentation statistiquement significative chez les patients souffrant à la fois de maladies parodontales et de caries. Cette augmentation est observée pour *V. parvula* par rapport aux patients sains, et pour *S. oralis,* par rapport à tous les autres groupes étudiés.

Les profils de *Fusobacterium nucleatum* et *Prevotella melaninogenica,* deux bactéries du complexe orange, apparaissent similaires. En effet, leur nombre de copies par µg d'ADN augmente en présence de maladies parodontales, qu'elles soient associées ou non à des caries, comparativement au groupe de patients sains. *Haemophilus parainfluenzae* présente, quant à elle, une augmentation uniquement dans le groupe de patients atteints de maladies parodontales, par rapport aux patients présentant uniquement des caries.

Deux autres bactéries du complexe orange, *Prevotella nigrescens* et *Megasphaera micronuciformis,* montrent également des différences statistiquement significatives. *P. nigrescens* voit sa concentration augmenter fortement chez les patients souffrant de maladies parodontales associées à des caries, comparé à tous les autres états de santé bucco-dentaire. *M. micronuciformis* montre une augmentation chez les patients alliant maladies parodontales et caries dentaires, par rapport aux patients sains et à ceux présentant uniquement des caries. Une différence significative est également observée entre les patients atteints de maladies parodontales et les patients sains.

Pour les bactéries potentiellement infectieuses *Centipeda periodontii* et *Selenomas sputigena*, une augmentation de leur quantité est observée lorsque les maladies parodontales sont associées à des caries, comparativement aux patients sains ou atteints uniquement de caries (pour *C. periodontii*).

Enfin, trois des quatre bactéries du complexe rouge de Socransky, à savoir *Treponema denticola*, *Tannerella forysthia* et *Filifactor alocis*, présentent des différences statistiquement significatives. Toutes montrent une augmentation dans le groupe de patients atteints de maladies parodontales associées à des caries, par rapport aux patients sains. *T. denticola,* en particulier, est plus abondante dans ce groupe que dans les trois autres groupes étudiés.

d. Analyse comparative des résultats obtenus dans les salives et les écouvillons gingivaux

Pour comparer les quantités de bactéries et de virus présentes dans le microbiote oral entre les deux types d'échantillons, nous avons réalisé un test t de Student pour données appariées.

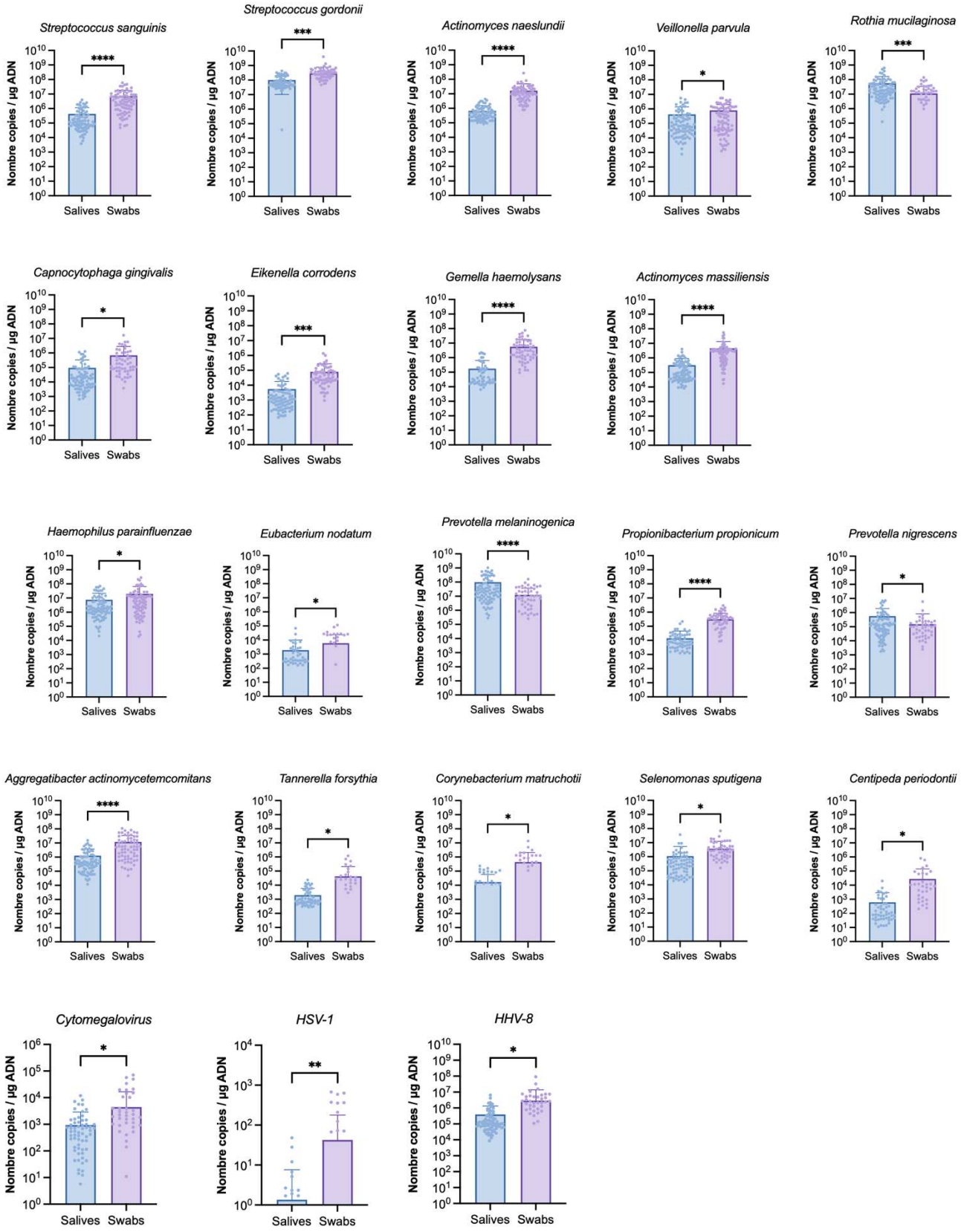


Figure 24 : Comparaison des abondances microbiennes dans les crachats salivaires et les écouvillons gingivaux.
Analyse des moyennes du nombre de copies par µg d'ADN pour différentes espèces bactériennes et virales, comparant les échantillons de crachats salivaires (n=83) et les écouvillons gingivaux (swabs) (n=83). Les comparaisons ont été effectuées à l'aide d'un test t pour données appariées. Les significativités des p-values utilisées par le logiciel Prism sont les suivantes : 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

Les résultats de la Figure 24 montrent, de manière générale, que le nombre de copies par µg d'ADN est significativement plus élevé dans les échantillons prélevés par écouvillon salivaire par rapport aux échantillons de crachat salivaire, à l'exception de trois espèces bactériennes : *Rothia mucilaginosa*, *Prevotella melaninogenica* et *Prevotella nigrescens*.

3. Conclusions

La technologie du Biomark™ HD présente des avantages notables, offrant notamment un excellent rapport coût-efficacité en termes de temps, d'argent et de volumes d'échantillons nécessaires. Elle permet de cibler simultanément un grand nombre de gènes et de fournir des résultats quantitatifs absolus. L'array que nous avons développé constitue une première étape dans la mise au point d'un outil de PCR à haut débit capable d'analyser et de quantifier 48 espèces microbiennes du microbiote oral simultanément dans 48 ou 96 échantillons à la fois.

Nos premiers résultats, obtenus à partir d'échantillons salivaires, montrent une bonne concordance entre la qPCR conventionnelle et la technologie du Biomark™ HD, tant en termes de qualité de méthode que de reproductibilité. Cependant, l'optimisation de la sensibilité et de l'efficacité de la PCR sur la technologie du Biomark™ HD est encore en cours pour améliorer ses performances. Nous prévoyons également de valider nos résultats sur les quantifications des HHV en comparant la quantification de nos ADN étalons et certains échantillons, à celles obtenues à l'aide de kits commerciaux (Altona), dans le but d'optimiser la détection des 8 HHV sur le Biomark™ HD.

Afin de confirmer nos résultats initiaux et affiner la sélection de nos cibles, nous envisageons d'utiliser le séquençage NGS via le MinION de Nanopore technologies. Ces premiers résultats montrent déjà une modification significative de la composition du microbiote oral en fonction des différents profils de santé bucco-dentaire ainsi que des sites de prélèvements (salives et écouvillons).

En outre, cette technologie offre une grande flexibilité, permettant d'adapter les cibles microbiennes en fonction des exigences spécifiques de chaque projet. Cet outil sera utilisé dans plusieurs projets au

sein de notre laboratoire, notamment dans le cadre du projet ORASPORT (détaillé dans le Chapitre 4 : Impact du sport d'endurance sur l'écosystème oral ; Frontières du mode vie), qui explore le lien entre l'activité physique et le microbiote oral. Le projet ORAMICAL se concentre sur l'étude du microbiote oral chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, tandis que le projet PREPERMIO analysera le microbiote oral de patients suivis pour des soins d'hygiène bucco-dentaire.

Chapitre 4 : Impact du sport d'endurance sur l'écosystème oral ; Frontières du mode de vie

I. Introduction

Une dynamique émergente vise à établir des liens entre le profil microbien oral et la santé globale des individus (Metwaly, Reitmeier, and Haller 2022), (Ashley et al. 2015). Le microbiote oral suscite un intérêt particulier en raison de la richesse et de la diversité microbiologique qu'il abrite, ainsi que l'accessibilité de la cavité buccale pour des prélèvements non invasifs et répétés. Le microbiote oral est non seulement représentatif de la santé orale, mais aussi un indicateur pertinent de la santé globale. Dans ce contexte, le projet ORASPORT se concentre sur l'analyse des modifications du microbiote oral, ou « signatures microbiennes », en relation avec divers facteurs, notamment la pratique d'une activité physique d'endurance. Ce projet constitue une innovation majeure dans le domaine, car si de nombreuses études proposent d'établir des relations entre la microbiologie orale et les pathologies, très peu d'études étudient l'impact du mode de vie sur le microbiote oral chez des individus en bonne santé. Cela est d'autant plus innovant concernant l'impact de l'activité physique dont on découvre de plus en plus l'importance sur la santé humaine. De plus, cette étude présente une envergure importante, tant en termes du nombre de participants que de la précision quantitative des espèces étudiées, n'a encore jamais été réalisée.

L'hypothèse du projet ORASPORT est que la sédentarité et la pratique du sport à haut intensité induisent des altérations significatives de l'écosystème oral, comparées à une activité physique modérée. Si la pratique régulière d'une activité physique est reconnue pour ses effets protecteurs sur la santé, une activité à haute intensité pourrait, en revanche, favoriser certaines infections et pathologies (Simpson et al. 2020). Cela est notamment observé dans la cavité buccale, où une détérioration de la santé bucco-dentaire est constatée chez les athlètes de haut niveau. Bien que les mécanismes sous-jacents à cette détérioration soient encore mal compris, ces observations suggèrent une interaction complexe entre la biologie orale et la condition physique. Ces aspects sont plus particulièrement abordés et discutés dans la revue narrative que nous avons publiée récemment et présentée ci-dessous (Dubois, Ortis, et al. 2024).

II. Revue narrative : Microbiote oral et santé bucco-dentaire des sportifs

En collaboration avec le Dr. Margaux Dubois, nous avons réalisé une revue de la littérature destinée à regrouper les informations disponibles concernant l'impact de la pratique sportive sur la santé orale et son microbiote. Ce travail a mené à la publication de l'article « Microbiote oral et santé bucco-dentaire des sportifs : revue narrative » dans le journal *Cahier de nutrition et diététique*, le 31 mars 2024. Nous avons orienté notre recherche vers un sous-groupe encore peu documenté : les sportifs, dont le mode

de vie, les habitudes alimentaires et la pratique sportive intense pourraient influencer le microbiote oral. De manière synthétique, cet article met en évidence que les athlètes, en particulier ceux qui pratiquent des sports d'endurance, sont exposés à des risques accrus pour leur santé bucco-dentaire, notamment dû à la consommation fréquente de boissons énergétiques, à leur hygiène buccale insuffisante, la sécheresse buccale et à la respiration par la bouche...

Impact du sport sur le microbiote oral :

Des études antérieures ont démontré que la pratique sportive, en particulier à haute intensité, peut induire des changements hormonaux, une augmentation de la température corporelle ainsi que des modifications du pH buccal. Ces facteurs perturbent l'équilibre du microbiote oral, favorisant la prolifération de bactéries pathogènes au détriment des espèces commensales. Par exemple, le stress oxydatif provoqué par l'exercice intense peut modifier les populations bactériennes présentes dans la cavité orale, augmentant le risque de maladies bucco-dentaires.

Notre revue fait état de plusieurs études révélant que les sportifs de haut niveau sont ainsi plus susceptibles de développer des caries et des maladies parodontales que la population générale. Ces déséquilibres du microbiote oral pourraient également avoir des répercussions sur la santé générale des athlètes, notamment en contribuant à la prévalence d'infections respiratoires et d'inflammations chroniques.

Prévention et recommandations :

Face à ces constats, nous avons formulé quelques recommandations visant à améliorer la santé bucco-dentaire des sportifs :

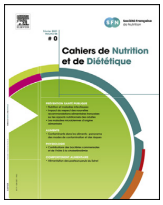
- Renforcer l'hygiène bucco-dentaire : Un brossage plus fréquent, l'utilisation de brossettes interdentaires et/ou de films dentaires, ainsi que l'utilisation d'un dentifrice à haute teneur en fluor sont recommandés pour prévenir les maladies orales.
- Adopter une hydratation adaptée : Il est conseillé de privilégier l'eau plutôt que les boissons énergétiques pour maintenir une hydratation adéquate. En cas de consommation de boissons sucrées ou acides, il est recommandé de se rincer la bouche à l'eau immédiatement après.
- Suivi régulier par des dentistes : Les sportifs devraient consulter régulièrement leur dentiste pour un suivi personnalisé, incluant des contrôles du pH buccal, des nettoyages professionnels et des conseils nutritionnels adaptés à leur mode de vie.

Cette revue a permis de démontrer l'impact significatif du sport de haut niveau sur la santé bucco-dentaire, en raison des habitudes de vie spécifiques des athlètes et des modifications physiologiques liées à l'exercice intense. Une gestion anticipée et la mise en place de mesures de prévention adaptées est essentielle pour préserver l'équilibre du microbiote oral et limiter les risques de pathologies orales. Il est crucial de sensibiliser les athlètes ainsi que les professionnels de santé à ces enjeux, afin d'intégrer les soins bucco-dentaires dans les stratégies de suivi des athlètes.

Cahiers de nutrition et de diététique xxx (xxxx) xxx—xxx

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com



PHYSIOLOGIE

Microbiote oral et santé bucco-dentaire des sportifs : revue narrative

Oral microbiota and health in athletes: A comprehensive overview

Margaux Dubois[a,b,1], **Morgane Ortis**[a,1], **Alain Doglio**[a,c], **Valérie Bougault**[d,*]

[a] *Micoralis, université Côte d'Azur, 06300 Nice, France*
[b] *Institut de médecine bucco-dentaire, centre hospitalier universitaire de Nice, pôle odontologie, 06300 Nice, France*
[c] *Unité de thérapie cellulaire et génique, centre hospitalier universitaire de Nice, 06000 Nice, France*
[d] *LAMHESS, université Côte d'Azur, 06205 Nice, France*

Received 12 January 2024; accepted 31 March 2024

MOTS CLÉS
Microbiote oral;
Santé;
Sportif;
Alimentation;
Stress

Résumé L'étude des microbiotes connaît un essor important avec l'avènement et la démocratisation des techniques de séquençage. Parmi eux, la cavité orale héberge le deuxième microbiote en masse, et le premier en termes de diversité. Chez des personnes en bonne santé, la composition du microbiote oral reste stable, cependant sous l'influence de différents facteurs, dont l'activité physique, la perturbation de cet équilibre peut mener à l'apparition de pathologies orales ou systémiques. Le sportif de haut niveau est exposé à un mode de vie particulier alliant des modifications immunitaires, un stress chronique, une alimentation riche en sucres et un risque accru de traumatismes oraux. La pratique d'un sport de manière intensive a des répercussions directes sur l'état de santé bucco-dentaire, mais peu de données sont disponibles concernant l'impact de la pratique sportive sur le microbiote oral. Après un descriptif du microbiote oral, cette revue a pour objectif de faire un état des connaissances actuelles sur le lien entre le microbiote oral, la santé et la performance du sportif.

© 2024 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS on behalf of Société française de nutrition. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

* Auteur correspondant. Laboratoire Motricité Humaine Expertise Sport Santé (LAMHESS), Université Côte d'Azur, Campus STAPS - Sciences du Sport, 261, Boulevard du Mercantour, 06205 Nice, France.
E-mail address: valerie.bougault@univ-cotedazur.fr (V. Bougault).
[1] Morgane Ortis et Margaux Dubois sont co-premières auteurs, elles ont contribué à parts égales à ce travail.

https://doi.org/10.1016/j.cnd.2024.03.005
0007-9960/© 2024 Les Auteurs. Publié par Elsevier Masson SAS au nom de Société française de nutrition. Cet article est publié en Open Access sous licence CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Please cite this article as: M. Dubois, M. Ortis, A. Doglio et al., Microbiote oral et santé bucco-dentaire des sportifs : revue narrative, Cahiers de nutrition et de diététique, https://doi.org/10.1016/j.cnd.2024.03.005

KEYWORDS
Oral microbiota;
Health;
Sport;
Nutrition;
Stress

Summary The study of the microbiota has grown significantly with the advent and democratization of sequencing technologies. The oral cavity hosts the second most diverse microbiota in the human body. In healthy individuals, the composition of the oral microbiota is stable, but disruption of its balance can lead to the development of oral or systemic pathologies under certain factors, including physical activity. Professional athletes are exposed to a specific lifestyle that combines changes in the immune system, chronic stress, specific diets, sugar consumption during exercise and/or an increased risk of oral trauma. Intense sporting activity therefore has an impact on oral and dental health. However, there is currently a paucity of data on oral microbiota in athletes. After describing the oral microbiota, the aim of this article is to review the current state of knowledge on the relationship between oral microbiota health and performance.
© 2024 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS on behalf of Société française de nutrition. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Introduction

Le microbiote se réfère à l'ensemble des micro-organismes vivant dans un environnement spécifique. Dans le corps humain, le microbiote oral occupe la deuxième place en termes de taille, après le microbiote intestinal, tout en présentant la plus grande diversité microbienne [1]. Ces micro-organismes jouent un rôle essentiel dans la préservation de la santé bucco-dentaire, notamment en influençant divers processus, tels que la prolifération de pathogènes ou la modulation de la réponse immunitaire locale [2]. La compréhension du microbiote oral, de la dynamique du biofilm oral, et du rôle des bactéries revêt une importance cruciale dans l'élaboration de stratégies de prévention des affections bucco-dentaires et de la santé orale [3]. En effet, la rupture de l'eubiose orale entraîne un déséquilibre qui, s'il persiste, peut conduire à une dysbiose microbienne et au développement de pathologies buccales [4]. Au-delà de la sphère orale, plusieurs études mettent en évidence les liens qui existent entre la dysbiose orale et la santé générale. En effet, diverses maladies systémiques, notamment neurologiques, respiratoires, métaboliques et cardiovasculaires sont parfois directement associées à des pathologies orales qui présentent une étiologie microbienne [5].

Le microbiote oral peut être modulé et influencé par divers facteurs, notamment les habitudes de vie, les facteurs systémiques, l'environnement et la pratique sportive. Bien que la pratique régulière d'une activité physique soit généralement associée à des effets positifs sur la santé, plusieurs études indiquent que les sportifs de compétition présentent souvent une santé bucco-dentaire globalement altérée [6]. Les raisons de cette observation peuvent être attribuées au mode de vie particulier des sportifs, comprenant des pratiques telles que des choix alimentaires spécifiques, le port éventuel de protège-dents, l'hyperpnée d'effort, le stress lié à la recherche de performance et la compétition.

Cette revue débutera par une introduction aux concepts de l'équilibre du microbiote et aux pathologies orales fréquemment liées. Ensuite, elle examinera le lien entre le sport, le microbiote oral, l'inflammation orale et la santé bucco-dentaire, en détaillant les divers facteurs influents.

La cavité orale et le microbiote

La communauté microbienne complexe qui réside dans la cavité buccale est appelée microbiote oral [7]. La cavité orale constitue un écosystème riche, complexe et non uniforme, présentant d'importantes variations quotidiennes pour le microbiote résident [8]. Dans ce milieu, plus de 1000 espèces de micro-organismes co-existent, comprenant des bactéries, des virus, des champignons, des archées et quelques protozoaires [9]. Cet écosystème, caractérisé par sa très grande hétérogénéité, son humidité et sa chaleur, offre un terrain propice au développement des micro-organismes sur diverses surfaces, telles que les dents, la langue, la salive, les muqueuses, le palais, les poches parodontales... [1]. Les populations microbiennes présentes varient en fonction des différentes niches écologiques de la cavité orale. La plaque dentaire constitue une composante importante du microbiote oral, elle se caractérise par la présence de bactéries adhérentes aux dents (supports durs) qui se multiplient et co-adhèrent pour former une matrice extracellulaire polysaccharidique, également appelée biofilm oral. La formation du biofilm mature est un processus dynamique qui implique des interactions complexes, résumées sous le terme d'oralome, entre les différentes espèces bactériennes, virales et fongiques. La diversité de ces micro-organismes joue un rôle essentiel dans le maintien de la stabilité et du bon fonctionnement du microbiote oral. La composition de celui-ci est unique à chaque individu et pourrait même définir une « carte d'identité » personnelle. Si l'on ne considère que les bactéries, on identifie environ 700 espèces dont la composition est influencée par divers facteurs majeurs tels que les habitudes alimentaires, l'âge, le système immunitaire, le tabagisme, les facteurs génétiques et l'hygiène

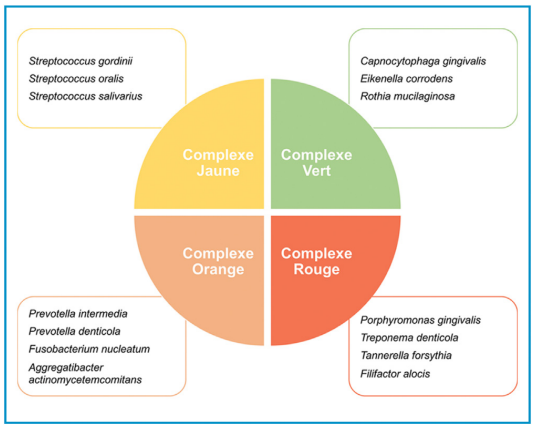


Figure 1. Représentation imagée des espèces bactériennes prédominantes liées aux divers complexes de Socransky et al. [11].

bucco-dentaire [10]. Socransky et al. [11] ont proposé de catégoriser ces bactéries en différents complexes, distingués par un code couleur. Cette classification est basée sur la pathogénicité des bactéries, leur rôle dans l'inflammation, et surtout leur contribution au développement de maladies parodontales, telle que la parodontite (Fig. 1). L'équilibre entre ces complexes définit une bonne santé parodontale, tandis qu'un déséquilibre favorisera plutôt l'apparition de maladies orales. Le complexe jaune est essentiellement composé de bactéries à Gram positives, du genre *Streptococcus* (ex : *S. oralis, S. salivarius*...). Ces bactéries pionnières sont les premières à coloniser les surfaces dentaires, elles initient la formation du biofilm oral et favorisent l'adhérence d'autres micro-organismes à celui-ci [12]. Le complexe vert (ex : *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*...) est constitué de bactéries considérées comme relativement inoffensives, voire bénéfiques, ces bactéries contribuent à maintenir l'équilibre du microbiote oral (eubiose). Le complexe orange (ex : *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*...) est composé de bactéries généralement associées à des formes modérées de maladies parodontales. L'augmentation de leur fréquence dans la plaque dentaire peut contribuer à l'inflammation gingivale et à la progression des maladies parodontales, parfois associées aux bactéries du complexe rouge. Enfin, un groupe triadique de bactéries anaérobies buccales appelé « complexe rouge », comprenant *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia*, est traditionnellement considéré comme jouant un rôle étiologique majeur dans la parodontite. Récemment, une nouvelle bactérie parodontopathogène, *Filifactor alocis*, a été ajoutée à ce trio bactérien [13]. Il est cependant important de noter que le modèle du complexe de Socransky est un modèle simplifié et que depuis la création de cette théorie en 1998, de nombreuses avancées technologiques dans le domaine de la microbiologie orale sont apparues permettant d'élargir notre compréhension sur les communautés microbiennes orales et les pathologies buccales [13].

Microbiote oral et santé bucco-dentaire

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ la moitié de la population mondiale, soit 3,5 milliards de personnes, est touchée par des affections bucco-dentaires, incluant les maladies cariogènes et parodontales [14]. En Europe, la prévalence des maladies bucco-dentaires graves est particulièrement élevée, touchant 50 % de la population adulte [15].

La maladie carieuse

La maladie carieuse représente le trouble bucco-dentaire le plus répandu à l'échelle mondiale, cette maladie affecte près de 2,5 milliards de personnes [14]. Il s'agit d'une maladie considérée comme non transmissible, caractérisée par une origine multifactorielle et polymicrobienne. La maladie carieuse apparaît lorsque le microbiote évolue vers un biofilm cariogène, comprenant des populations bactériennes acidogènes et aciduriques capables de métaboliser des glucides fermentables (glucose, fructose, maltose et saccharose) pour produire des acides, l'acide lactique étant prédominant [8]. Ces produits du métabolisme bactérien s'accumulent dans le biofilm, diminuant le pH et induisant la déminéralisation de la couche superficielle de la dent, ce qui constitue la première étape du processus carieux. Au fil du temps, si les phases de déminéralisation surpassent celles de reminéralisation, la structure de la dent peut être altérée [16]. Certaines espèces bactériennes sont prédominantes dans le microbiote associé aux lésions carieuses, en particulier *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus sp.* et *Actynomycetes sp.* [16]. *Streptococcus mutans* est particulièrement incriminée dans le développement de la maladie carieuse, bien que l'apparition de la maladie ne puisse être attribuée à la seule présence de cette bactérie [16]. Certaines espèces bactériennes peuvent, au contraire, exercer un effet protecteur contre le développement des bactéries cariogènes, comme c'est le cas pour trois espèces de *Streptococcus*, dont *S. oralis*, *S. mitis* et *S. sanguinis* [17]. Le concept actuel le plus communément accepté est celui de l'hypothèse dite de la plaque écologique. Ce modèle suggère que la lésion carieuse est la conséquence d'un changement, ou dysbiose, dans le microbiote du biofilm dentaire caractérisé par l'enrichissement en espèces cariogènes [16]. Une des principales causes de la dysbiose microbienne concerne la consommation régulière de sucres provenant de l'alimentation [16,18]. L'apport sucré favorise les bactéries acidophiles adaptées à cet environnement et diminue la présence d'espèces qui ne tolèrent pas ces conditions. Toutefois, de nombreux facteurs, autres que les sucres, jouent un rôle majeur dans le développement des caries, qu'ils soient physiologiques, comme la réduction de la production de salive, environnementaux, comme une mauvaise hygiène buccale, ou bien comportementaux telle que la consommation d'aliments acides [16].

Maladies parodontales

Selon l'OMS [19], les maladies parodontales constituent la deuxième affection bucco-dentaire la plus répandue dans le monde, touchant près d'un milliard de personnes (soit 19 % de la population). En France, les formes sévères de

ces affections concernent 10 à 20 % des adultes [20]. En particulier, la parodontite et la gingivite sont les deux maladies parodontales les plus connues ; il s'agit de maladies inflammatoires polyfactorielles et d'étiologie microbienne qui affectent et altèrent le parodonte. Le parodonte englobe l'ensemble des tissus de soutien de la dent comprenant la gencive, le ligament dentaire et l'os alvéolo-dentaire. La gingivite est souvent considérée comme une situation inflammatoire transitoire qui, si elle n'est pas traitée, peut évoluer vers la parodontite qui constitue un stade inflammatoire irréversible pouvant aller jusqu'à la destruction des tissus de soutien de la dent, y compris de l'os alvéolaire.

L'écosystème parodontal héberge une flore microbienne complexe dont la composition est très directement associée aux maladies parodontales. La prolifération de nombreux genres bactériens parodontopathogènes dans les sites sous-gingivaux et la diminution de la diversité globale du microbiote parodontal, définissent une dysbiose qui accompagne la dérégulation des réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte [21]. Les bactéries impliquées dans la parodontite sont essentiellement des bactéries anaérobies, vivant dans un environnement pauvre en oxygène tel que les poches parodontales. Cette pathologie résulte d'une synergie polymicrobienne, où l'ensemble de la communauté bactérienne joue un rôle dans le développement de cette dernière. Socransky et al. [11] ont proposé en 1998 de regrouper les espèces parodontales par complexes (complexes rouge, orange, jaune, violet, vert) qui sont définis en fonction de leur association avec la pathologie. Toutefois, avec l'avancée des techniques de détection des micro-organismes (telles que le séquençage), la participation dans la production de facteurs de virulence de bactéries qui n'étaient initialement pas impliquées dans la maladie parodontale telles que *S. oralis*, *S. mutans*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *V. parvula et P. fluorescens*, ont également été mise en évidence [22]. La présence de ces bactéries pathogènes facultatives, au sein de ces niches écologiques, entraîne le développement d'une inflammation gingivale caractéristique de la parodontite [23]. De plus, des données récentes sont en faveur d'une synergie entre ces bactéries parodontopathogènes et l'activation de certains virus oraux, en particulier les virus du groupe des Herpès virus humains (HHVs). Trois des huit HHVs, à savoir, le cytomégalovirus (CMV), l'herpès simplex 1 (HSV-1), ainsi que le virus d'Epstein-Barr virus (EBV) sont très prévalents dans les cas de parodontites agressives et chroniques [24]. Des travaux récents, en particulier menés par notre équipe, documentent l'exacerbation de la réplication de ces virus dans les sites parodontaux au cours de la parodontite [25].

L'expression clinique des maladies parodontales est également influencée par de nombreux autres facteurs, parmi lesquels figurent la consommation de tabac, l'accumulation de plaque dentaire, le diabète et l'immunodépression [26]. Le tabagisme, en particulier, représente un facteur de risque significatif dans le développement des maladies parodontales, car il diminue la capacité du corps humain à lutter contre les infections en affaiblissant le système immunitaire [26].

Lien entre le sport, la santé bucco-dentaire et le microbiote oral

Une étude récente, menée en Finlande sur une cohorte de jeunes hommes enrôlés pendant leur service militaire, a révélé que les individus qui pratiquaient régulièrement une activité physique et présentaient une bonne condition physique avaient moins de problèmes bucco-dentaires que leurs homologues sédentaires [27]. Cependant, le faible tabagisme et la faible consommation d'alcool observés chez les plus actifs pourraient constituer un biais important dans cette étude. Les premières études sur la santé bucco-dentaire des sportifs de haut niveau datent de la fin des années 1960 [28,29], et se sont considérablement accélérées après les Jeux Olympiques (J.O.) d'Athènes en 2004. L'école dentaire de l'université d'Athènes a orchestré les services de santé dentaire pendant les Jeux Olympiques et Paralympiques, destinés aux athlètes, entraîneurs, membres des équipes et personnels du village olympique [30]. Une clinique dentaire a ensuite été mise en place lors des Jeux Olympiques et paralympiques d'été, et la prévalence des problèmes de santé bucco-dentaires a été documentée pour les J.O. de Beijing en 2008 et Londres en 2012 [31]. L'équipe dirigée par le Professeur Needleman, en charge de la clinique dentaire des J.O., notamment à Londres, a effectué une revue systématique des recherches cliniques sur la santé bucco-dentaire des sportifs de haut-niveau [32]. Dans cette revue, ils confirment que les athlètes olympiques représentent une proportion conséquente des études menées, et parmi les 34 études considérées, jusqu'à 75 % des sportifs présentaient des caries dentaires, 76 % souffraient de gingivites, 15 % étaient atteints de maladies parodontales, 36 à 85 % montraient des signes d'usures dentaires, et 5 à 39 % étaient sujets à des infections liées aux dents de sagesses [32]. Les participants aux *Special Olympics*, destinés aux enfants et adultes compétiteurs ayant une déficience intellectuelle, ont également été étudiés, et il ressort que ceux-ci ne sont pas épargnés par les problèmes dentaires non traités, tels que les dents manquantes, les gingivites ou les caries [33]. Les causes de la mauvaise santé bucco-dentaire chez le sportif peuvent être d'origine externe au sport, avec par exemple des différences d'accès aux soins et d'alimentation entre les pays. Les causes intrinsèques au sport, sont celles pouvant altérer le microbiote oral et les défenses immunitaires, comme la répétition d'efforts intenses, la ventilation importante et répétée, la nutrition d'effort (boissons, gels...), le port de protège-dents, le stress et les causes traumatiques (Fig. 2).

Sécheresse/déshydratation orale transitoire

À mesure que la ventilation d'effort augmente, les cavités nasales deviennent insuffisantes pour répondre aux besoins de l'organisme, entraînant une respiration buccale [35]. Cette situation diminue le rôle d'humidification et de réchauffement de l'air par les structures nasales, et provoque une déshydratation plus rapide de l'ensemble du système respiratoire, dont la cavité orale [36]. Au-delà

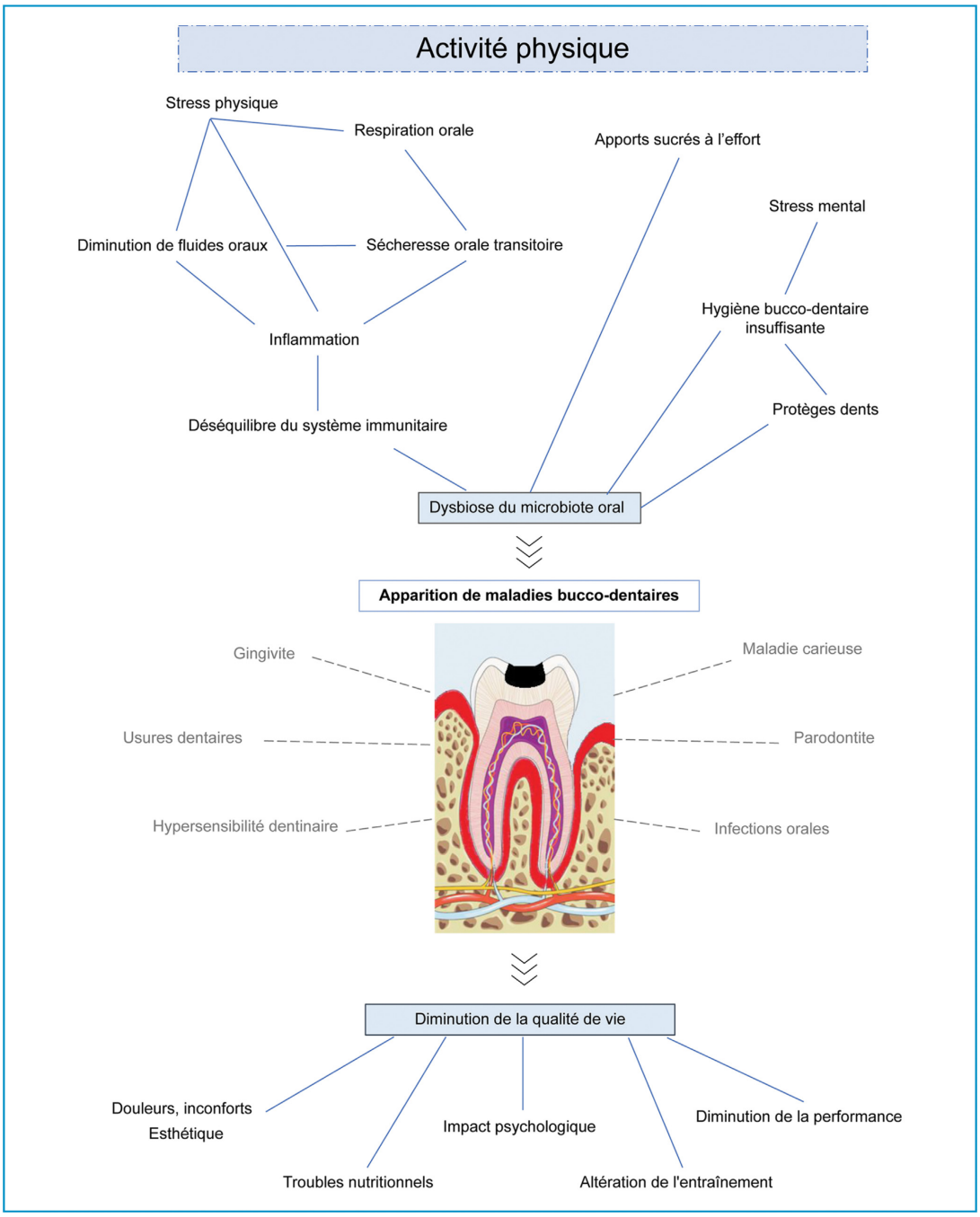


Figure 2. Synthèse des différents facteurs de l'exercice physique sur le développement de maladies bucco-dentaires et la modification de la qualité de vie. Figure inspirée de [34].

d'un certain niveau de ventilation, probablement autour du seuil d'adaptation ventilatoire, un seuil de déshydratation salivaire existe [37]. La déshydratation buccale peut résulter de la déshydratation générale et de la perte d'eau par la transpiration, de la stimulation du système sympathique à l'effort provoquant une vasoconstriction et une réduction du volume salivaire global, ainsi que de la restriction de l'apport liquide ou du type de liquide consommé pendant l'exercice [37—39]. Il semble que la prise d'eau seule ne compense pas la diminution de flux salivaire lors d'un l'exercice intense, contrairement à une eau enrichie en glucides [39]. L'assèchement transitoire prolongé de la cavité orale pendant un exercice physique long et répété est certainement un facteur de risque de déséquilibre de l'écosystème oral et par conséquence de pathologies bucco-dentaires. Une dysbiose orale pourrait ainsi s'établir rapidement dans la situation où le flux salivaire est régulièrement réduit [40]. On constate effectivement que les sportifs présentant un assèchement de la cavité buccale pendant l'effort et une diminution du flux salivaire ont davantage d'érosion dentaire [41], malgré des habitudes déclarées d'apport en eau à l'effort.

Nutrition du sportif

La nutrition est un élément non négligeable dans l'entraînement du sportif, avec des besoins spécifiques selon les objectifs et le type de sport. Les boissons d'efforts, qu'elles soient iso, hypo- ou hypertoniques, renferment un mélange de glucides, éventuellement accompagné de caféine, antioxydants, électrolytes et acides aminés. Les sportifs adaptent généralement leur apport en glucides avant, pendant et après l'exercice en fonction des conditions et des objectifs. Pendant l'entraînement et les compétitions, il est également courant de recourir à des boissons, gels ou barres énergétiques sucrées [39]. Les sportifs font aussi appel aux propriétés de certains aliments/boissons pour se supplémenter, ou modifier leur alimentation (café, jus de betterave, probiotiques, B-alanine, etc.) pour optimiser leur performance [42,43] et d'autres suppriment des catégories d'aliments de leurs régimes habituels (gluten, produits laitiers, viande...) [44—46]. Comme décrit précédemment, les sucres présents dans l'alimentation augmentent la proportion de bactéries du genre *Streptococcus* qui sont capables de fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique [47]. Des ingestions fréquentes et répétées telles que les prises de boissons d'effort, ainsi que la prise d'aliments à texture collante tels que les gels et barres, sont des facteurs de risques de la maladie carieuse [48]. L'acidité titrable est la mesure la plus pertinente pour connaître le pouvoir érosif d'une boisson ou d'un aliment. Elle permet de connaître l'acidité totale de l'aliment. Plus l'acidité titrable est élevée, plus il faudra de temps pour que le pH salivaire retourne à un pH neutre. Une étude sur les boissons sportives montre une grande variabilité dans le pH et l'acidité titrable entre les différentes marques de boissons [49]. Le pH des boissons varie entre 3,2 et 8,1 et l'acidité titrable entre 0 et 85,8 mmol NaOH/L selon les marques [49]. Le pH critique de l'émail se situe à 5,5. En dessous de ce pH, l'émail est altéré. C'est pourquoi, les boissons d'effort avec un pH supérieur à 5,5 et une acidité titrable faible sont à privilégier afin de limiter les phénomènes d'érosion dentaire. Il est ainsi conseillé au sportif de se rincer systématiquement la bouche avec de l'eau après la prise d'un supplément sucré [50]. Les choix nutritionnels des sportifs ont donc un impact sur le microbiote oral et par conséquent sur la physiologie de l'organisme. Cela comprend également leurs choix alimentaires quotidiens et régimes spéciaux [51]. Ainsi il a été montré par exemple que l'adoption d'un régime cétogène augmentait l'abondance relative d'*Haemophilus*, *Neisseria* et *Prevotella*, et augmentait celle des *Streptococcus*, altérant ainsi la voie salivaire du NO, comparativement à un régime plus riche en glucides [51].

Stress et sport

Le sportif de haut niveau est régulièrement exposé au stress. La peur de l'échec, l'insatisfaction professionnelle et les blessures, sont de nombreux facteurs provocateurs de stress chez les sportifs de haut niveau [52]. La réaction du corps au stress peut compromettre les mécanismes de défense de l'organisme. L'apparition d'un stress induit des modifications dans l'expression de certaines protéines et hormones telles que le cortisol, l'adrénaline et la noradrénaline [53]. L'augmentation de la production de ces molécules permet la lipolyse, la glycogénolyse et donc la production d'énergie qui pourra être distribuée aux différents organes afin de répondre au stress. Le stress chronique participe à l'apparition de maladies systémiques. Ces modifications locales et systémiques peuvent altérer l'homéostasie du microbiote oral et participer à l'apparition de pathologies telles que les parodontites [54].

Le dosage du cortisol salivaire est utilisé comme indicateur de stress. Le cortisol possède un rôle central dans la réponse physiologique et comportementale lors d'une activité physique et/ou un stress psychologique. Une étude a permis de mettre en évidence une corrélation linéaire entre la concentration de cortisol salivaire et la durée et intensité d'un exercice physique [55]. Des études in vitro ont montré la capacité du biofilm oral à modifier son expression génétique en présence de cortisol. Le traitement du milieu de culture avec la présence de noradrénaline et d'adrénaline stimule la croissance des bactéries *Actinomyces gerenscseriae, Actinomyces naeslundii, Eikenella corrodens et Campylobacter gracilis,* mais inhibe la croissance de *Porphyromonas gingivalis et Tannerella forsythia* [56]. Dans ce contexte, il est intéressant de constater que le stress psychologique a été associé à un appauvrissement de la diversité bactérienne orale [57]. Ces altérations microbiologiques liées au stress pourraient engendrer des maladies orales, notamment les lésions carieuses, qui paraissent liées à un fort taux de cortisol salivaire [57]. L'augmentation d'autres biomarqueurs associés au stress comme la déhydroépiandrostérone (DHEA) ou l'α-amylase ont également été associés à la sévérité de la maladie parodontale [58].

Traumatismes orofaciaux

Les traumatismes oraux, fréquents dans les sports, notamment de combat avec une prévalence moyenne d'environ

30 %, principalement en boxe, affectent souvent les incisives maxillaires et peuvent entraîner des lésions gingivales et articulaires [59,60]. Le traitement de ces traumatismes est chronophage et coûteux, avec des implications à long terme sur la santé physique et mentale des sportifs [61]. Le port de casques et de protège-dents est crucial pour prévenir ces blessures, le protège-dents jouant un rôle essentiel en réduisant significativement la prévalence des traumatismes dentaires [62]. Une méta-analyse a montré que la prévalence de traumatisme dentaire passait de 48,3 % pour les non-porteurs à 7,8 % chez les porteurs de protège-dents [63].

L'entretien du protège-dent, siège potentiel de développement de micro-organismes buccaux, est crucial. Une étude sur des protège-dents semi-adaptables portés par des joueurs de hockey et de football a révélé la présence importante de levures, moisissures et bactéries, dont *Staphylococcus spp., Micrococcus spp., et Candida parapsilosis* [64]. Bien que le protège-dent reste essentiel pour réduire le risque de traumatismes dentaires, son entretien, après chaque utilisation, est nécessaire pour préserver l'équilibre buccal. Les méthodes de nettoyage, physique ou chimique, doivent éviter l'alcool et l'eau chaude pour éviter la dégradation. De nouvelles méthodes de désinfection sont recherchées afin d'éliminer le biofilm sans endommager le protège-dent [65].

Sport, microbiote oral et immunité

Les microbiotes de l'organisme interagissent de façon constante avec l'immunité, ce dialogue permanent maintient l'immunité dans un état d'alerte maîtrisée (veille immunitaire) qui assure une homéostasie favorable de toutes les muqueuses de l'organisme (orales, intestinales, cutanées, génitales...). La salive peut être considérée comme un miroir du corps humain car elle reflète de nombreuses situations physiologiques et pathologies [66,67]. Par son prélèvement relativement aisé, et son caractère non-invasif, elle devient peu à peu un nouvel outil de diagnostic et de surveillance ainsi qu'une méthode de prélèvement alternative aux prélèvements sanguins. L'effort physique intense peut influencer les fonctions immunitaires systémiques et locales et donc peut altérer l'écosystème mucosal et favoriser la pathogenèse. L'utilisation de prélèvements salivaires pourrait permettre d'observer ces modifications et de renseigner sur un état de déséquilibre de manière plus générale [68].

Infections respiratoires des voies aériennes supérieures et immunité

L'étude de biomarqueurs immunitaires et inflammatoires détectés au cours des infections respiratoires des voies aériennes supérieures met en évidence le rôle clé des Immunoglobulines de type A (IgA). Les IgA sont des anticorps sécrétés en abondance au niveau des muqueuses pour assurer leur protection, notamment dans la lutte contre les infections. Plusieurs études montrent que le taux d'IgA sécrétées augmente après un effort intense unique, mais diminue après une période d'entraînement chez les sportifs entraînés [69]. Au cours d'une saison d'entraînement intensifs réguliers, les athlètes présentent une diminution de la concentration et/ou des taux d'IgA et de protéines anti-microbiennes, les rendant ainsi plus sensibles aux risques d'infections des voies respiratoires supérieures [67]. Une relation entre la diminution des IgA dans la salive et la présence des infections respiratoires des voies aériennes supérieures a été observée, mais elle reste toutefois à être approfondie [69].

Les données actuelles montrent que le virus Epstein-Barr (EBV) pourrait représenter un bon marqueur microbiologique oral, témoin des effets de la pratique sportive sur l'immunité. EBV est un virus de la famille des herpès virus, il réside à vie notamment dans la cavité orale grâce à l'alternance de phases d'infections actives (réactivations) et de phases silencieuses de latence. Plusieurs études documentent la réactivation orale d'EBV chez des individus pratiquant du rugby, du football, de la natation ou de la course à pied [70—73]. Il est proposé que, chez ces pratiquants, la réduction de la production d'IgA soit responsable de la réactivation d'EBV au niveau salivaire [70], cependant ces résultats n'ont pas été confirmés [72]. Les niveaux sériques d'IgA anti-EBV sont également corrélés aux niveaux salivaires de différentes bactéries comme *Streptococcus sanguinis* (complexe jaune) et *Capnocytophaga sputigena* (complexe vert) [74,75]. Ce schéma pourrait être également influencé par la composition du microbiote oral, dans la mesure où plusieurs études indiquent que la bactérie *Porphyromonas gingivalis*, (complexe rouge de la théorie de Socransky et al.) pourrait être impliquée [8]. Ces éléments suggèrent que la réactivation d'EBV au niveau salivaire pourrait refléter un état général immunitaire, notamment associé à la pratique sportive [71].

Santé orale et performances

Il est actuellement reconnu qu'une mauvaise santé bucco-dentaire, qui se traduit par une inflammation et des douleurs dentaires, a des répercussions négatives sur les performances sportives [32,34]. Parmi des athlètes, 5 à 18 % estiment qu'un mauvais état de santé bucco-dentaire affecte négativement leur entraînement ou leur compétition [32,34]. Plus de 40 % sont gênés par leur santé bucco-dentaire, 20 à 50 % estiment qu'elle a un impact sur leur vie quotidienne, 35 % sur la prise alimentaire, et 15 % sur la récupération [34]. Les sports les plus touchés sont la natation et le football [67]. Une mauvaise santé orale impacte indirectement la santé psychosociale des sportifs en réduisant leur qualité de vie, leur estime de soi et leur confiance en eux. Par ailleurs, la parodontite a été associée à une diminution des scores de condition physique ainsi que de la force de préhension et de la vitesse de marche chez des personnes âgées [76,77]. Les problèmes de santé bucco-dentaires semblent être associés à un déclin plus rapide de la forme physique liée à l'âge [77].

Conclusion

Si l'activité physique régulière semble favorable à un bon état de santé bucco-dentaire et à un microbiote symbiotique, sa pratique intensive pourrait modifier ce

constat. Les sportifs de haut niveau sont ainsi souvent sujets à des pathologies bucco-dentaires ainsi qu'à l'apparition d'une dysbiose orale. De nombreux facteurs environnementaux et comportementaux peuvent être impliqués dans ce processus. Les changements immunitaires inhérents à l'entraînement d'endurance, un régime alimentaire composé de nombreuses supplémentations à l'effort, le stress, le port d'un protège-dent ainsi qu'un manque de suivi bucco-dentaire sont des paramètres fréquemment associés aux déséquilibres oraux. Les modifications du système immunitaire et du microbiote oral pourraient refléter un changement d'état général lié à l'entraînement intensif, et le suivi du milieu oral des sportifs en lien avec les infections ou pathologies sont des pistes de recherche à venir. D'avantage d'études sur le lien entre les interactions du microbiote oral, la santé orale et la performance sportive sont nécessaires afin de proposer ultérieurement des remédiations.

Points essentiels

- Le microbiote oral est un écosystème fragile et complexe, subissant de fortes variations quotidiennes.
- La stabilité du microbiote oral est essentielle pour limiter l'apparition de maladies bucco-dentaires.
- Les athlètes de haut niveau sont considérés comme une population à risque de maladies bucco-dentaires.
- Une relation bidirectionnelle entre performances sportives et état de santé bucco-dentaire existe et est à prendre en compte dans la gestion globale de l'athlète.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

References

[1] Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. Br Dent J 2016;221:657—66, http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865.
[2] Li X, Liu Y, Yang X, Li C, Song Z. The oral microbiota: community composition, influencing factors, pathogenesis, and interventions. Front Microbiol 2022;13:895537, http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.895537.
[3] Peng X, Cheng L, You Y, Tang C, Ren B, Li Y, et al. Oral microbiota in human systematic diseases. Int J Oral Sci 2022;14:14, http://dx.doi.org/10.1038/s41368-022-00163-7.
[4] Arweiler NB, Netuschil L. The oral microbiota. Adv Exp Med Biol 2016;902:45—60, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4.
[5] Sudhakara P, Gupta A, Bhardwaj A, Wilson A. Oral dysbiotic communities and their implications in systemic diseases. Dent J 2018;6:10, http://dx.doi.org/10.3390/dj6020010.
[6] Needleman I, Ashley P, Fine P, Haddad F, Loosemore M, de Medici A, et al. Oral health and elite sport performance. Br J Sports Med 2015;49:3—6, http://dx.doi.org/10.1136/bjsports-2014-093804.
[7] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, et al. The human oral microbiome. J Bacteriol 2010;192:5002—17, http://dx.doi.org/10.1128/JB.00542-10.
[8] Radaic A, Kapila YL. The oralome and its dysbiosis: new insights into oral microbiome-host interactions. Comput Struct Biotechnol J 2021;19:1335—60, http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.010.
[9] Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. Biomed Pharmacother 2018;99:883—93, http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146.
[10] Santonocito S, Giudice A, Polizzi A, Troiano G, Merlo EM, Sclafani R, et al. A cross-talk between diet and the oral microbiome: balance of nutrition on inflammation and immune system's response during periodontitis. Nutrients 2022;14:2426, http://dx.doi.org/10.3390/nu14122426.
[11] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998;25:134—44, http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x.
[12] Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of oral streptococci. Microbiol Spectr 2018:6, http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
[13] Aja E, Mangar M, Fletcher HM, Mishra A. Filifactor alocis: recent insights and advances. J Dent Res 2021;100:790—7, http://dx.doi.org/10.1177/00220345211000656.
[14] OMS. Selon l'OMS, le défaut de soins bucco-dentaires touche près de la moitié de la population mondiale. https://www.who.int/fr/news/item/18-11-2022-who-highlights-oral-health-neglect-affecting-nearly-half-of-the-world-s-population (accédé le 05 décembre 2023).
[15] OMS. Maladies bucco-dentaires : l'OMS/Europe appelle à agir d'urgence alors que la région européenne enregistre les taux de prévalence les plus élevés au monde. https://www.who.int/europe/fr/news/item/20-04-2023-who-europe-calls-for-urgent-action-on-oral-disease-as-highest-rates-globally-are-recorded-in-european-region (accédé le 05 décembre 2023).
[16] Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. Nat Rev Dis Primers 2017;3:17030, http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.30.
[17] Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. ISME J 2012;6:46—56, http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.85.
[18] Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. Pol J Microbiol 2014;63:127—35.
[19] OMS. Santé bucco-dentaire. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/oral-health (accédé le 05 décembre 2023).
[20] Ministère de la Santé et de la Prévention. https://sante.gouv.fr/prevention-en-sante/preserver-sa-sante/article/sante-bucco-dentaire (accédé le 05 décembre 2023).
[21] Kumar PS. Microbial dysbiosis: the root cause of periodontal disease. J Periodontol 2021;92:1079—87, http://dx.doi.org/10.1002/JPER.21-0245.
[22] Yost S, Duran-Pinedo AE, Teles R, Krishnan K, Frias-Lopez J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. Genome Med 2015;7:27, http://dx.doi.org/10.1186/s13073-015-0153-3.
[23] Nemoto T, Shiba T, Komatsu K, Watanabe T, Shimogishi M, Shibasaki M, et al. Discrimination of bacterial community structures among healthy, gingivitis, and periodontitis statuses through integrated metatranscriptomic and network analyses. mSystems 2021;6:e0088621, http://dx.doi.org/10.1128/mSystems.00886-21.

[24] Slots J. Periodontal herpesviruses: prevalence, pathogenicity, systemic risk. Periodontol 2015;69:28—45, http://dx.doi.org/10.1111/prd.12085.
[25] Olivieri CV, Raybaud H, Tonoyan L, Abid S, Marsault R, Chevalier M, et al. Epstein-Barr virus-infected plasma cells in periodontitis lesions. Microb Pathog 2020;143:104128, http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104128.
[26] Darby I. Risk factors for periodontitis & peri-implantitis. Periodontol 2022;90:9—12, http://dx.doi.org/10.1111/prd.12447.
[27] Huttunen M, Kämppi A, Soudunsaari A, Päkkilä J, Tjäderhane L, Laitala M-L, et al. The association between dental caries and physical activity, physical fitness, and background factors among Finnish male conscripts. Odontology 2023;111:192—200, http://dx.doi.org/10.1007/s10266-022-00717-5.
[28] Forrest JO. The dental condition of Olympic Games contestants-a pilot study, 1968. Dent Pract Dent Rec 1969;20:95—101.
[29] Domitti SS. [Importance of dentistry in sports]. Bol Fac Odontol Piracicaba 1969;31:15—7.
[30] Vougiouklakis G, Tzoutzas J, Farmakis E-T, Farmakis E-E, Antoniadou M, Mitsea A. Dental data of the Athens 2004 Olympic and Paralympic Games. Int J Sports Med 2008;29:927—33, http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1038489.
[31] Yang X-J, Schamach P, Dai J-P, Zhen X-Z, Yi B, Liu H, et al. Dental service in 2008 Summer Olympic Games. Br J Sports Med 2011;45:270—4, http://dx.doi.org/10.1136/bjsm.2010.075283.
[32] 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;49:14—9, http://dx.doi.org/10.1136/bjsports-2014-093617.
[33] Al-Shamlan SO, Mohammad M, Papandreou D. Oral health status of athletes with intellectual disabilities: a review. Open Access Maced J Med Sci 2019;7:2044—9, http://dx.doi.org/10.3889/oamjms.2019.539.
[34] Merle CL, Wuestenfeld JC, Fenkse F, Wolfarth B, Haak R, Schmalz G, et al. The significance of oral inflammation in elite sports: a narrative review. Sports Med Int Open 2022;6:E69—79, http://dx.doi.org/10.1055/a-1964-8538.
[35] Niinimaa V, Cole P, Mintz S, Shephard RJ. The switching point from nasal to oronasal breathing. Respir Physiol 1980;42:61—71, http://dx.doi.org/10.1016/0034-5687(80)90104-8.
[36] Daviskas E, Gonda I, Anderson SD. Local airway heat and water vapour losses. Respir Physiol 1991;84:115—32, http://dx.doi.org/10.1016/0034-5687(91)90023-c.
[37] Chicharro JL, Lucía A, Pérez M, Vaquero AF, Ureña R. Saliva composition and exercise. Sports Med 1998;26:17—27, http://dx.doi.org/10.2165/00007256-199826010-00002.
[38] Tanabe-Ikegawa M, Takahashi T, Churei H, Mitsuyama A, Ueno T. Interactive effect of rehydration with diluted sports drink and water gargling on salivary flow, pH, and buffering capacity during ergometer exercise in young adult volunteers. J Oral Sci 2018;60:269—77, http://dx.doi.org/10.2334/josnusd.17-0183.
[39] Bishop NC, Blannin AK, Armstrong E, Rickman M, Gleeson M. Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flow rate and IgA response to cycling. Med Sci Sports Exerc 2000;32:2046—51, http://dx.doi.org/10.1097/00005768-200012000-00013.
[40] Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. Periodontol 2016;70:80—92, http://dx.doi.org/10.1111/prd.12098.
[41] Mulic A, Tveit AB, Songe D, Sivertsen H, Skaare AB. Dental erosive wear and salivary flow rate in physically active young adults. BMC Oral Health 2012;12:8, http://dx.doi.org/10.1186/1472-6831-12-8.
[42] Vicente-Salar N, Santos-Sánchez G, Roche E. Nutritional ergogenic aids in racquet sports: a systematic review. Nutrients 2020;12:2842, http://dx.doi.org/10.3390/nu12092842.
[43] Vicente-Salar N, Fuster-Muñoz E, Martínez-Rodríguez A. Nutritional ergogenic aids in combat sports: a systematic review and meta-analysis. Nutrients 2022;14:2588, http://dx.doi.org/10.3390/nu14132588.
[44] Parnell JA, Wagner-Jones K, Madden RF, Erdman KA. Dietary restrictions in endurance runners to mitigate exercise-induced gastrointestinal symptoms. J Int Soc Sports Nutr 2020;17:32, http://dx.doi.org/10.1186/s12970-020-00361-w.
[45] Graybeal AJ, Kreutzer A, Willis JL, Braun-Trocchio R, Moss K, Shah M. The impact of dieting culture is different between sexes in endurance athletes: a cross-sectional analysis. BMC Sports Sci Med Rehabil 2022;14:157, http://dx.doi.org/10.1186/s13102-022-00549-4.
[46] Devrim-Lanpir A, Hill L, Knechtle B. Efficacy of popular diets applied by endurance athletes on sports performance: beneficial or detrimental? A narrative review. Nutrients 2021;13:491, http://dx.doi.org/10.3390/nu13020491.
[47] Baskan A, Zorba E. Examination of some bacteria types in the oral microbiota of athletes and sedentary individuals. Pak J Med Health Sci 2022;16:423—8, http://dx.doi.org/10.53350/pjmhs22162423.
[48] Gupta P, Gupta N, Pawar AP, Birajdar SS, Natt AS, Singh HP. Role of sugar and sugar substitutes in dental caries: a review. ISRN Dent 2013;2013:519421, http://dx.doi.org/10.1155/2013/519421.
[49] Sport & Exercise Medicine Switzerland. Osmolality, pH, and titratable acidity of sports drinks on the Swiss market. SEMS-J 2018. https://sems-journal.ch/3852 (accédé le 05 décembre 2023).
[50] Needleman I, Ashley P, Fairbrother T, Fine P, Gallagher J, Kings D, et al. Nutrition and oral health in sport: time for action. Br J Sports Med 2018;52:1483—4, http://dx.doi.org/10.1136/bjsports-2017-098919.
[51] Murtaza N, Burke LM, Vlahovich N, Charlesson B, O'Neill HM, Ross ML, et al. Analysis of the effects of dietary pattern on the oral microbiome of elite endurance athletes. Nutrients 2019:11, http://dx.doi.org/10.3390/nu11030614.
[52] Rice SM, Gwyther K, Santesteban-Echarri O, Baron D, Gorczynski P, Gouttebarge V, et al. Determinants of anxiety in elite athletes: a systematic review and meta-analysis. Br J Sports Med 2019;53:722—30, http://dx.doi.org/10.1136/bjsports-2019-100620.
[53] Paudel D, Uehara O, Giri S, Yoshida K, Morikawa T, Kitagawa T, et al. Effect of psychological stress on the oral-gut microbiota and the potential oral-gut-brain axis. Jpn Dent Sci Rev 2022;58:365—75, http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2022.11.003.
[54] Reners M, Brecx M. Stress and periodontal disease. Int J Dent Hyg 2007;5:199—204, http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5037.2007.00267.x.
[55] Gatti R, De Palo EF. An update: salivary hormones and physical exercise. Scand J Med Sci Sports 2011;21:157—69, http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01252.x.
[56] Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PPE, Williams PH, Chapple ILC. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria in vitro. Oral Microbiol Immunol 2002;17:296—303, http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-302X.2002.170506.x.
[57] Paudel D, Kuramitsu Y, Uehara O, Morikawa T, Yoshida K, Giri S, et al. Proteomic and microbiota analyses of the oral cavity during psychological stress. PLoS One 2022;17:e0268155, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0268155.

[58] Cakmak O, Tasdemir Z, Aral CA, Dundar S, Koca HB. Gingival crevicular fluid and saliva stress hormone levels in patients with chronic and aggressive periodontitis. J Clin Periodontol 2016;43:1024—31, http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12614.
[59] Gallagher J, Ashley P, Petrie A, Needleman I. Oral health and performance impacts in elite and professional athletes. Community Dent Oral Epidemiol 2018;46:563—8, http://dx.doi.org/10.1111/cdoe.12392.
[60] Polmann H, Melo G, Conti Réus J, Domingos FL, de Souza BDM, Padilha AC, et al. Prevalence of dentofacial injuries among combat sports practitioners: a systematic review and meta-analysis. Dent Traumatol 2020;36:124—40, http://dx.doi.org/10.1111/edt.12508.
[61] Andersson L. Epidemiology of traumatic dental injuries. J Endod 2013;39:S2—5, http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.021.
[62] Mordini L, Lee P, Lazaro R, Biagi R, Giannetti L, Sport, et al. Sport and dental traumatology: surgical solutions and prevention. Dent J (Basel) 2021;9:33, http://dx.doi.org/10.3390/dj9030033.
[63] Fernandes LM, Neto JCL, Lima TFR, Magno MB, Santiago BM, Cavalcanti YW, et al. The use of mouthguards and prevalence of dento-alveolar trauma among athletes: a systematic review and meta-analysis. Dent Traumatol 2019;35:54—72, http://dx.doi.org/10.1111/edt.12441.
[64] Glass RT, Wood CR, Bullard JW, Conrad RS. Possible disease transmission by contaminated mouthguards in two young football players. Gen Dent 2007;55:436—40.
[65] Hayashi H, Naiki Y, Murakami M, Oishi A, Takeuchi R, Nakagawa M, et al. Effects of cleaning sports mouthguards with ethylene-vinyl acetate on oral bacteria. Peer J 2022;10:e14480, http://dx.doi.org/10.7717/peerj.14480.
[66] Maki KA, Kazmi N, Barb JJ, Ames N. The oral and gut bacterial microbiomes: similarities, differences, and connections. Biol Res Nurs 2021;23:7—20, http://dx.doi.org/10.1177/1099800420941606.
[67] Tripodi D, Cosi A, Fulco D, D'Ercole S. The impact of sport training on oral health in athletes. Dent J (Basel) 2021;9:51, http://dx.doi.org/10.3390/dj9050051.
[68] Lindsay A, Costello JT. Realising the potential of urine and saliva as diagnostic tools in sport and exercise medicine. Sports Med 2017;47:11—31, http://dx.doi.org/10.1007/s40279-016-0558-1.
[69] Drummond LR, Campos HO, Drummond FR, de Oliveira GM, Fernandes JGRP, Amorim RP, et al. Acute and chronic effects of physical exercise on IgA and IgG levels and susceptibility to upper respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis. Pflugers Arch 2022;474:1221—48, http://dx.doi.org/10.1007/s00424-022-02760-1.
[70] Yamauchi R, Shimizu K, Kimura F, Takemura M, Suzuki K, Akama T, et al. Virus activation and immune function during intense training in rugby football players. Int J Sports Med 2011;32:393—8, http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1271674.
[71] Gleeson M, Pyne DB, Austin JP, Lynn Francis J, Clancy RL, McDonald WA, et al. Epstein-Barr virus reactivation and upper-respiratory illness in elite swimmers. Med Sci Sports Exerc 2002;34:411—7, http://dx.doi.org/10.1097/00005768-200203000-00005.
[72] Perkins E, Davison G. Epstein-Barr Virus (EBV) DNA as a potential marker of in vivo immunity in professional footballers. Res Q Exerc Sport 2022;93:861—8, http://dx.doi.org/10.1080/02701367.2021.1932707.
[73] Cox AJ, Gleeson M, Pyne DB, Saunders PU, Clancy RL, Fricker PA. Valtrex therapy for Epstein-Barr virus reactivation and upper respiratory symptoms in elite runners. Med Sci Sports Exerc 2004;36:1104—10, http://dx.doi.org/10.1249/01.mss.0000131957.40985.2b.
[74] Liao Y, Zhang J-B, Lu L-X, Jia Y-J, Zheng M-Q, Debelius JW, et al. Oral microbiota alteration and roles in Epstein-Barr virus reactivation in nasopharyngeal carcinoma. Microbiol Spectr 2023;11:e0344822, http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.03448-22.
[75] Ueda S, Uchiyama S, Azzi T, Gysin C, Berger C, Bernasconi M, et al. Oropharyngeal group A streptococcal colonization disrupts latent Epstein-Barr virus infection. J Infect Dis 2014;209:255—64, http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit428.
[76] Hämäläinen P, Rantanen T, Keskinen M, Meurman JH. Oral health status and change in handgrip strength over a 5-year period in 80-year-old people. Gerodontology 2004;21:155—60, http://dx.doi.org/10.1111/j.1741-2358.2004.00022.x.
[77] Kimble R, McLellan G, Lennon LT, Papacosta AO, Weyant RJ, Kapila Y, et al. Association between oral health markers and decline in muscle strength and physical performance in later life: longitudinal analyses of two prospective cohorts from the UK and the USA. Lancet Healthy Longev 2022;3:e777—88, http://dx.doi.org/10.1016/S2666-7568(22)00222-7.

III. Présentation du projet ORASPORT

L'étude ORASPORT est une étude pilote prospective et translationnelle, dont l'objectif principal est d'analyser le microbiote oral chez des individus en bonne santé, pratiquant une activité physique d'endurance à des niveaux différents. Outre l'étude du microbiote oral (qui représente une part essentielle de mon travail de thèse), ORASPORT inclut également un bilan de santé bucco-dentaire réalisé lors de chaque inclusion, ainsi qu'une collecte de données sur le mode de vie des participants. De plus, le contexte inflammatoire est évalué pour chaque prélèvement salivaire via le dosage d'un panel de cytokines inflammatoires (Travaux de M. Dubois, non publié).

A terme, ORASPORT a pour objectif d'identifier des bactéries orales, des virus ou des cytokines salivaires dont les quantités varient significativement en fonction du niveau d'activité physique pratiqué. Cela pourrait aboutir à l'identification d'espèces microbiennes orales associées à différents niveaux de condition physique et éventuellement à la définition de signatures microbiologiques orales multiparamétriques (microbiologie, marqueurs inflammatoires, santé orale) de la condition physique (Figure 25).

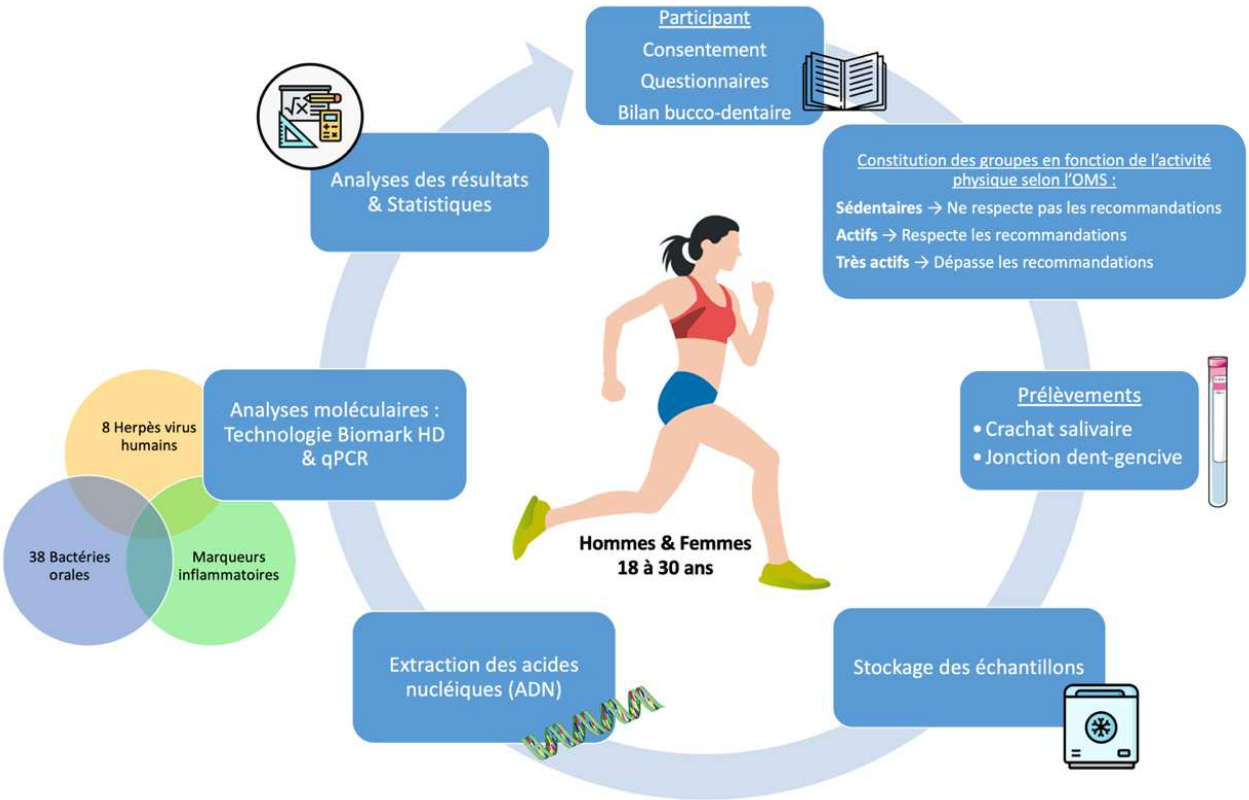


Figure 25 : Représentation schématique des différentes étapes de l'étude pilote ORASPORT.
Cette figure détaille le processus depuis le recrutement des participants (hommes et femmes âgés de 18 à 30 ans) jusqu'à la constitution des groupes selon les recommandations de l'OMS. Elle inclut

également la réalisation du bilan bucco-dentaire et des prélèvements, ainsi que les analyses statistiques de la composition de leur microbiote oral.

L'objectif secondaire de l'étude est d'évaluer l'état de santé bucco-dentaire des participants pour déterminer l'impact potentiel de l'activité physique d'endurance sur la santé orale. Ce projet, à l'interface entre la microbiologie, la médecine du sport et la santé publique, ouvre la voie à une meilleure compréhension des interactions entre activité physique, microbiote oral et santé globale.

1. Participants et déroulé de la visite d'inclusion

Les inclusions dans l'étude ORASPORT ont débuté en octobre 2022, avec pour objectif d'inclure 200 participants sur une période de 36 mois (2022-2025). A ce jour, 86 participants ont déjà été recrutés. Les participants sont répartis en trois groupes, appariés en âge, en fonction de leur niveau d'activité physique, selon les critères définis par l'OMS : insuffisant, recommandé, élevé.

Conformément à la législation française en vigueur (Loi de Santé Publique et Loi n°2012-300 du 05/03/2012, avec le décret d'application n°2016-1537 publié le 16/11/2016), le protocole de l'étude a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) le 07/02/2023. Les inclusions sont réalisées au Centre Hospitalier Universitaire dentaire de Nice, où les participants ont été pris en charge par le Dr. Margaux Dubois, chirurgienne-dentiste et co-investigatrice principale du projet.

Lors de la visite d'inclusion, chaque participant bénéficie d'un bilan bucco-dentaire complet ainsi que de deux prélèvements oraux : un prélèvement salivaire et un frottis gingival. Une lettre d'information est fournie, ainsi qu'un formulaire de non-opposition est signé par chaque participant permettant ainsi l'utilisation de leurs données à des fins de recherches. Les documents sont présentés en annexes. Les participants de l'étude ORASPORT remplissent un questionnaire qui détaille des paramètres généraux propres à chaque participant (âge, sexe, antécédents médicaux, tabac…), leurs habitudes de pratiques sportives et alimentaires. Le questionnaire intègre également deux questionnaires validés internationalement à savoir l'International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) et l'Oral Health Impact Profile-14 (OHIP-14). L'IPAQ permet d'évaluer les participants selon leur niveau d'activité physique (sportive ou non) au cours des 7 derniers jours en distinguant les activités modérées ou intenses, à la fois durant leur loisir ou au travail. L'OHIP-14 permet lui d'évaluer l'impact des problèmes de santé bucco-dentaire sur la qualité de vie d'une personne. L'ensemble du questionnaire est présenté en annexes.

Critères d'inclusion : les participants doivent être âgés de 18 à 30 ans, et ne pratiquer aucune activité

physique ou pratiquer principalement une activité physique sportive d'endurance (course à pied ou cyclisme).

Critères d'exclusion : sont exclus les participants qui pratiquent plus de 3 heures de natation par semaine, ou ayant pris des anti-inflammatoires dans les 48 heures précédant l'étude, ou ayant consommé des probiotiques et/ou des antibiotiques dans les 3 semaines précédant les prélèvements.

Cette méthodologie rigoureuse permet d'assurer une collecte uniforme et standardisée des données.

2. Définition des groupes d'étude

Selon le niveau d'activité physique (étude principale) : Les participants sont répartis en fonction de leur niveau de pratique d'activité physique d'endurance, selon les critères établis par l'OMS. Les recommandations de l'OMS préconisent de pratiquer entre 150 et 300 minutes d'activité physique modérée par semaine, ou entre 75 et 150 minutes d'activité physique intense, ou une combinaison équivalente des deux. Les participants qui respectent ces recommandations ont été qualifiés de « actifs ». Ceux qui ne respectent pas ces recommandations minimales ont été considérés comme « sédentaires ». En revanche, les participants dont l'activité physique dépassait largement les recommandations maximales de l'OMS ont été classés comme « très actifs ».

Selon le bilan de santé bucco-dentaire (étude ancillaire) : Le bilan bucco-dentaire comporte plusieurs paramètres cliniques permettant d'évaluer l'état de santé oral des participants, tels que : le nombre de dents absentes, la présence de caries, de restes radiculaires, d'obturations, l'indice TWI, l'indice de plaque, l'inflammation gingivale, ainsi que les mobilités et récessions dentaires. Sur la base de ces critères, les participants ont été classés en quatre groupes distincts : « Sains », « Caries », « Maladies parodontales », ou « Caries & Maladies parodontales ». Plus précisément, la présence d'au moins une carie active suffisait à classer un participant dans le groupe « Caries ». De même, la présence d'inflammation gingivale et/ou de mobilité dentaire était le critère pour inclure un patient dans le groupe « Maladies parodontales ». Le groupe « Caries & Maladies parodontales » incluait les patients présentant à la fois au moins une carie active et une inflammation gingivale et/ou une mobilité dentaire. Enfin, le groupe « Sains » regroupait les participants ne présentant ni caries actives, ni inflammation gingivale, ni mobilité dentaire.

3. Les prélèvements

Au cours du bilan bucco-dentaire, deux types de prélèvements buccaux sont réalisés (Figure 26). Afin

de standardiser les conditions de prélèvement, les participants sont invités à ne pas boire, manger, fumer ou brosser les dents dans les 30 minutes précédant le rendez-vous avec le chirurgien-dentiste. Le premier prélèvement consiste en 1 mL de salive non stimulée, recueilli dans un tube stérile. Le second prélèvement est un écouvillonnage gingival réalisé au niveau de la mandibule, à la jonction des dents et de la gencive. Les deux types de prélèvements sont conservés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN pour les analyses microbiologiques.

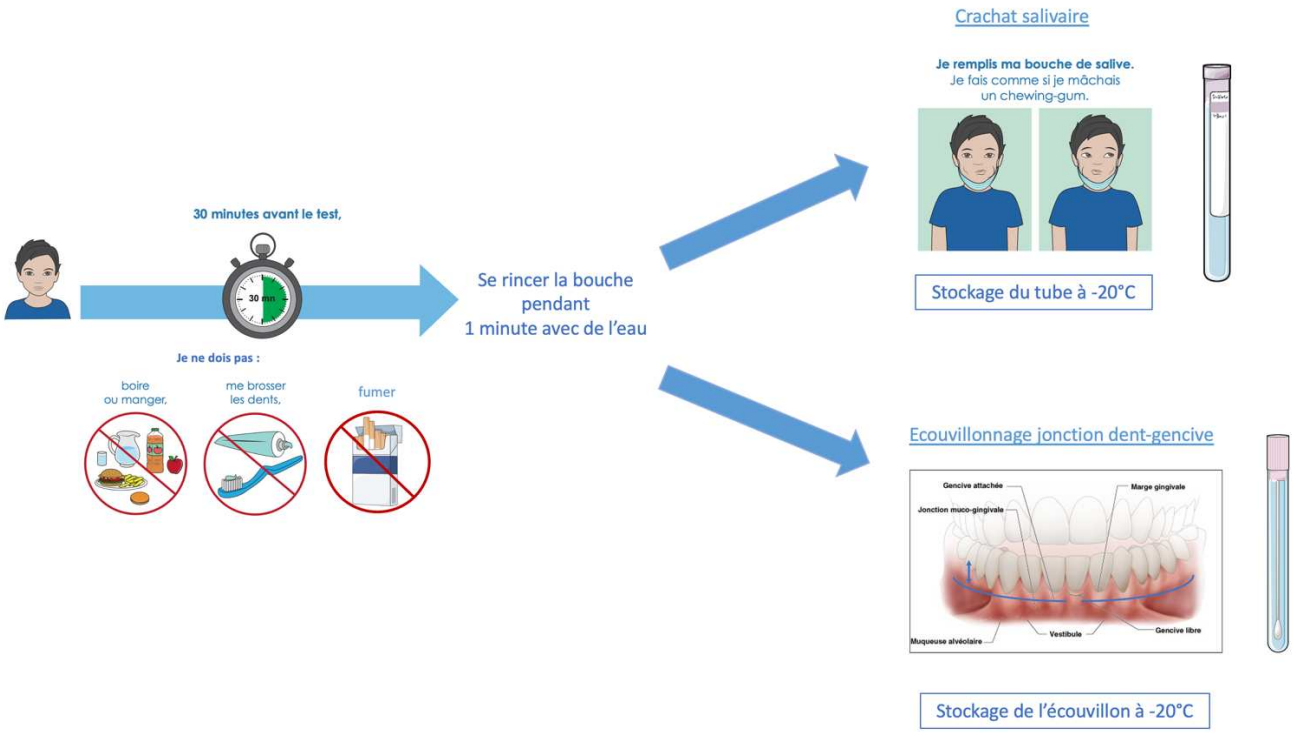


Figure 26 : Schéma illustratif de la procédure collecte des prélèvements salivaires.
Les participants sont invités à s'abstenir de boire, manger, fumer ou se brosser les dents dans les 30 minutes précédant le rendez-vous. Avant les prélèvements, ils se rincent la bouche avec de l'eau stérile pendant 1 minute. La collecte salivaire non stimulée (1 mL) est effectuée par crachat direct dans un tube prévu à cet effet. L'écouvillonnage gingival est ensuite réalisé en frottant pendant 30 secondes la jonction entre les dents et la gencive au niveau de la mandibule. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

IV. Traitements des échantillons

Les échantillons de salive et les écouvillons gingivaux sont traités selon les protocoles expérimentaux décrits dans la section « Validation de l'array de détection et de quantification du microbiote oral par

PCR microfluidique sur des prélèvements biologiques » du Chapitre 3. L'objectif principal est d'extraire l'ADN présent dans chaque échantillon, d'en analyser la qualité, puis de le quantifier avant son stockage à -20°C.

L'analyse microbiologique des échantillons a été réalisée par PCR à haut débit à l'aide de la technologie Biomark™ HD, qui permet la détection et la quantification de 48 espèces microbiennes spécifiques du microbiote oral. Les détails techniques de cette méthode, incluant les conditions de réaction et les contrôles, sont décrits dans la section « Développement de l'outil de détection et de quantification du microbiote oral sur le Biomark™ HD » du Chapitre 3.

V. Résultats & Discussion ORASPORT

1. Description des participants inclus dans l'étude (au 24/09/2024)

A ce jour, les participants recrutés pour l'étude ORASPORT sont globalement en bonne santé générale, conformément aux critères d'inclusion (âgés de 18 à 30 ans). Ce critère favorise le recrutement d'une population jeune, homogène et en bonne santé, minimisant ainsi les biais liés aux pathologies chroniques ou liées à l'âge. La motivation principale des participants à participer à l'étude repose davantage sur un intérêt pour cette étude que sur l'accès à un bilan dentaire, qui joue un rôle accessoire. A ce stade, l'étude ORASPORT présente encore certaines limitations, notamment en raison de la taille des effectifs et d'une répartition inégale entre les sexes dans les différents groupes d'activité physique sont présentes à ce jour. Un déséquilibre notable est observé dans la Figure 27, avec une prédominance de femmes dans le groupe sédentaire et une majorité d'hommes dans le groupe des participants très actifs. Ce déséquilibre pourrait influencer les résultats actuels mais l'étude n'est pas terminée et nous essayerons d'ajuster ces déséquilibres dans nos futures inclusions.

En raison de la taille encore modeste des effectifs dans chaque groupe, il n'a pas été possible d'effectuer des analyses statistiques robustes concernant la répartition des maladies bucco-dentaires entre les groupes d'activité physique. Néanmoins, une évaluation qualitative préliminaire des fréquences des pathologies orales n'indique pas de différences majeures entre les groupes sédentaires, actifs et très actifs à ce stade de l'étude (Figure 27). Des analyses plus approfondies seront nécessaires lorsque l'effectif cible sera atteint, permettant ainsi de tirer des conclusions plus solides sur l'impact de l'activité physique sur la santé bucco-dentaire.

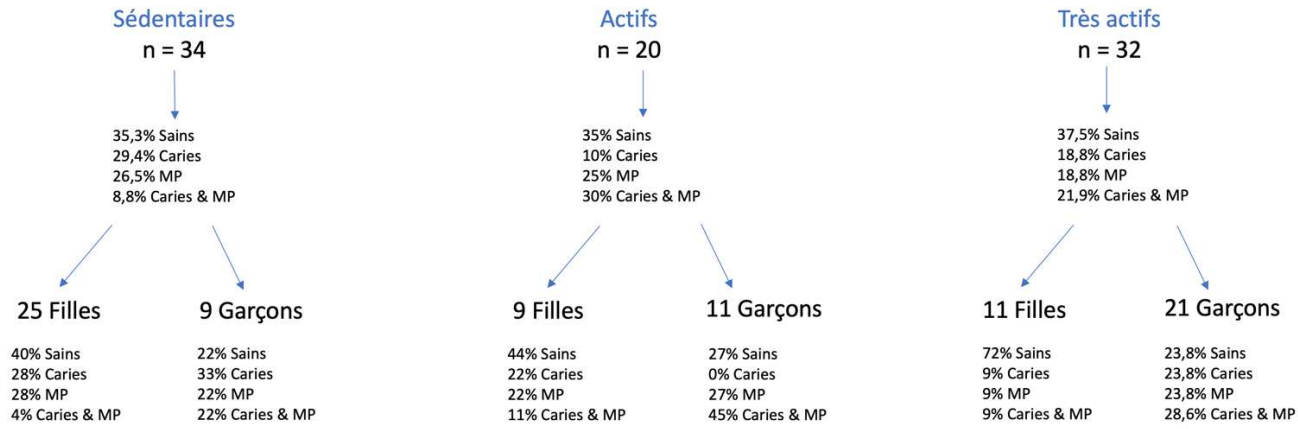


Figure 27 : Répartition des participants de l'étude ORASPORT en fonction de leur niveau d'activité physique.

Cette figure présente la proportion hommes/femmes dans chaque groupe de pratique sportive (sédentaires, actifs, très actifs), ainsi que la répartition selon les pathologies bucco-dentaires au sein de ces groupes. Ces données sont celles actualisées en septembre 2024 (n= 86). Les pathologies bucco-dentaires sont subdivisées en plusieurs catégories, notamment les caries et les maladies parodontales (MP). Les données visent à explorer d'éventuelles corrélations entre le niveau d'activité physique et la santé bucco-dentaire des participants.

2. Analyse de la composition microbienne de la salive des participants

L'ADN salivaire extrait de chaque participant a permis de quantifier simultanément les génomes de 38 bactéries orales et de 8 HHV, grâce à la technologie de PCR microfluidique que nous avons développée, comme décrit dans la section « Développement de l'outil de détection et de quantification du microbiote oral sur le Biomark™ HD » du Chapitre 3. La Figure 28 présente la heatmap illustrant les quantités moyennes de ces espèces microbiennes détectées dans la salive des 86 participants recrutés à ce jour, classés selon leur niveau d'activité physique conformément aux recommandations de l'OMS. Cette représentation visuelle permet de faire apparaitre des tendances concernant l'impact potentiel de l'activité physique d'endurance sur le microbiote oral.

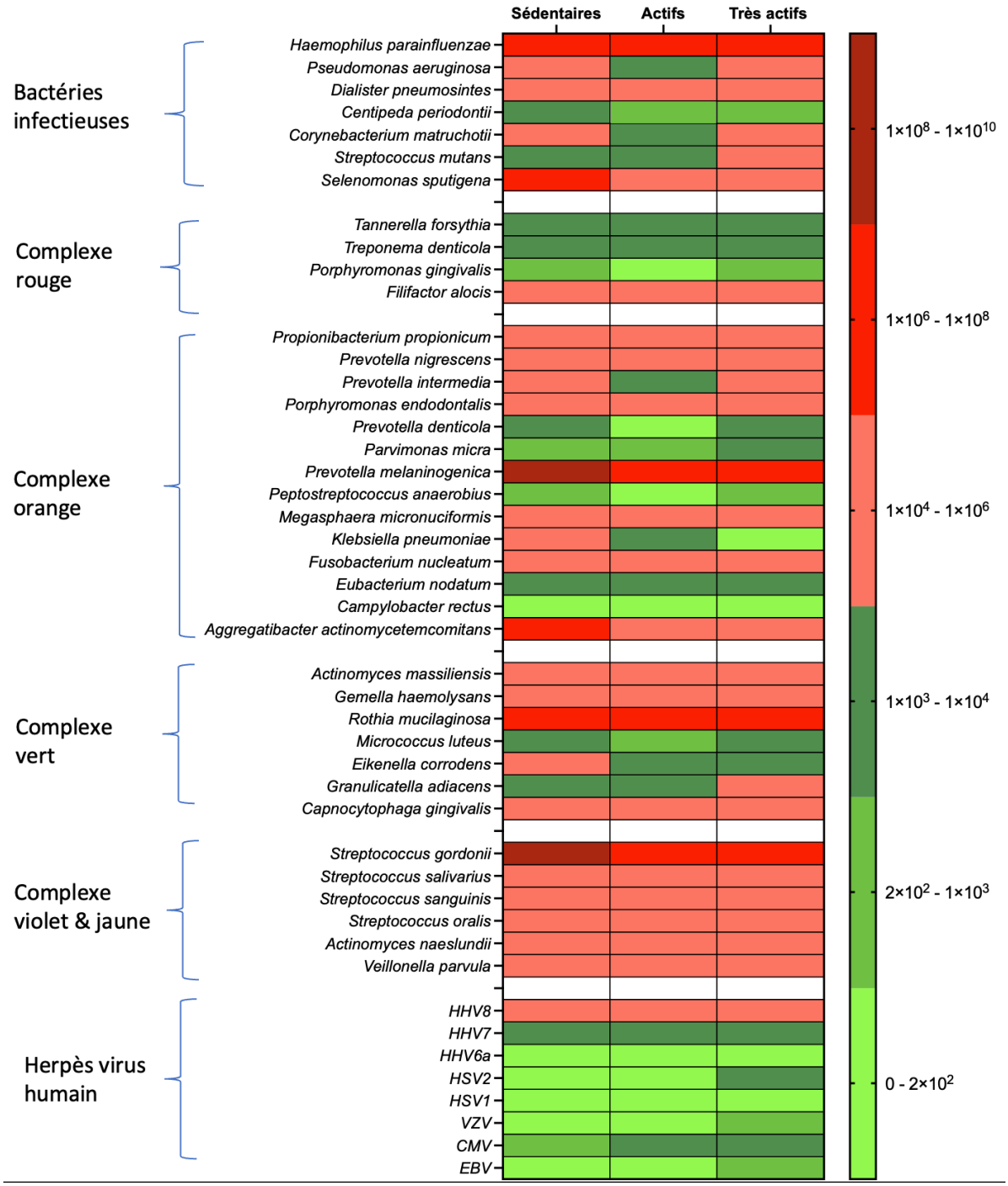


Figure 28 : Heatmap des abondances de 48 espèces microbiennes dans les prélèvements salivaires selon le niveau d'activité physique.

Cette heatmap compare l'abondance salivaire moyenne de 48 espèces microbiennes (nombre de copies par µg d'ADN), mesurée avec la technologie Biomark™ HD entre les différents groupes de participants à l'étude ORASPORT. Les groupes d'individus sont répartis selon leur niveau d'activité physique : sédentaires (n=34), actifs (n=20), et très actifs (n=32). Les espèces bactériennes sont classées selon la théorie de Socransky, permettant une interprétation plus fine des interactions microbiennes en lien avec la pratique d'une activité physique d'endurance.

Concernant les bactéries étudiées, on observe dans la Figure 28, que celles des complexes jaune et violet prédominent, avec notamment *Streptococcus gordonii*, une espèce abondante, en accord avec la littérature. Ces bactéries sont des pionnières dans la colonisation des surfaces dentaires, essentielles à la formation du biofilm oral et facilitant l'adhérence des autres micro-organismes. Aucune différence significative entre les groupes d'activité physique n'a été observée.

Le complexe vert montre une présence notable dans la salive, avec une forte présence de la bactérie *Rothia mucilaginosa*. Ces bactéries sont cruciales pour maintenir l'eubiose du microbiote oral, et sont généralement considérées comme bénéfiques. Cependant, trois autres bactéries du complexe semblent légèrement moins abondantes, à savoir *Micrococcus luteus*, *Eikenella corrodens* et *Granulicatella adiacens*.

Le complexe orange présente une hétérogénéité marquée dans les quantités bactériennes. Par exemple, *Campylobacter rectus* et *Peptostreptococcus anaerobius* sont assez peu présentes, tandis que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et notamment *Prevotella melaninogenica* sont très abondantes. Ces bactéries sont fréquemment associées à des formes modérées de maladies parodontales, contribuant à l'inflammation gingivale et à la progression de ces maladies, et sont parfois associées aux bactéries du complexe rouge. Sur cette représentation, il semblerait y avoir une diminution de certaines bactéries, notamment *P. melaninogenica*, *K. pneumoniae* et *A. actinomycetemcomitans* lorsque le niveau d'activité physique d'endurance pratiqué augmente.

Dans le complexe rouge, seule *Filifactor alocis* présente des concentrations élevées, alors que *Porphyromonas ginvigivalis* est présente en faible abondance. Comme décrit dans la section « Étiopathogénie des maladies parodontales », les bactéries de ce complexe sont impliquées de manière significative dans les maladies parodontales. Les variations observées entre les groupes restent mineures.

Les bactéries infectieuses, notamment *Haemophilus parainfluenzae*, *Selenomonas sputigena* et *Dialister pneumosintes* sont présentes en concentrations élevées, avec une prévalence notable de *Streptococcus mutans* chez les participants très actifs, une bactérie associée au développement des caries dentaires. Toutefois, le groupe des participants très actifs ne présente pas une prévalence plus élevée de caries par rapport aux autres groupes.

D'après la heatmap (Figure 28), les concentrations des HHV dans la salive restent globalement faibles pour l'ensemble des groupes. Ces résultats ne sont pas surprenants dans la mesure où les variations des charges virales HHV sont davantage attendues au niveau individuel plutôt qu'au niveau collectif, en raison des réactivations virales. On note cependant une tendance à l'augmentation des

concentrations pour HSV-2, CMV, VZV et EBV chez les participants pratiquant une activité sportive, notamment intense. Cependant, comme discuté dans le « Chapitre 3 : Détection quantitative simultanée à haut débit du microbiote oral ; Révéler la complexité », ces résultats doivent encore être confirmés par des expériences complémentaires.

La Figure 29 présente l'analyse biostatistique des données collectées. L'objectif était d'identifier les espèces microbiennes dont la présence varie de manière significative entre les groupes. Ces analyses, bien qu'encore très globales, offrent un premier aperçu des différences dans la composition du microbiote oral de la salive selon le niveau d'activité physique. Étant donné que les données ne suivaient pas une distribution normale, nous avons effectué un test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour comparer les moyennes du nombre de copies par µg d'ADN entre les trois groupes d'activité physique. Seules les espèces microbiennes montrant des différences significatives entre les moyennes des groupes sont présentées dans la Figure 29A. Nous avons également cherché à analyser s'il existait des différences significatives concernant une répartition par complexes bactériens, ces analyses étant réalisées en comparant les sommes des abondances de toutes les bactéries incluses dans chaque complexe (Figure 29B).

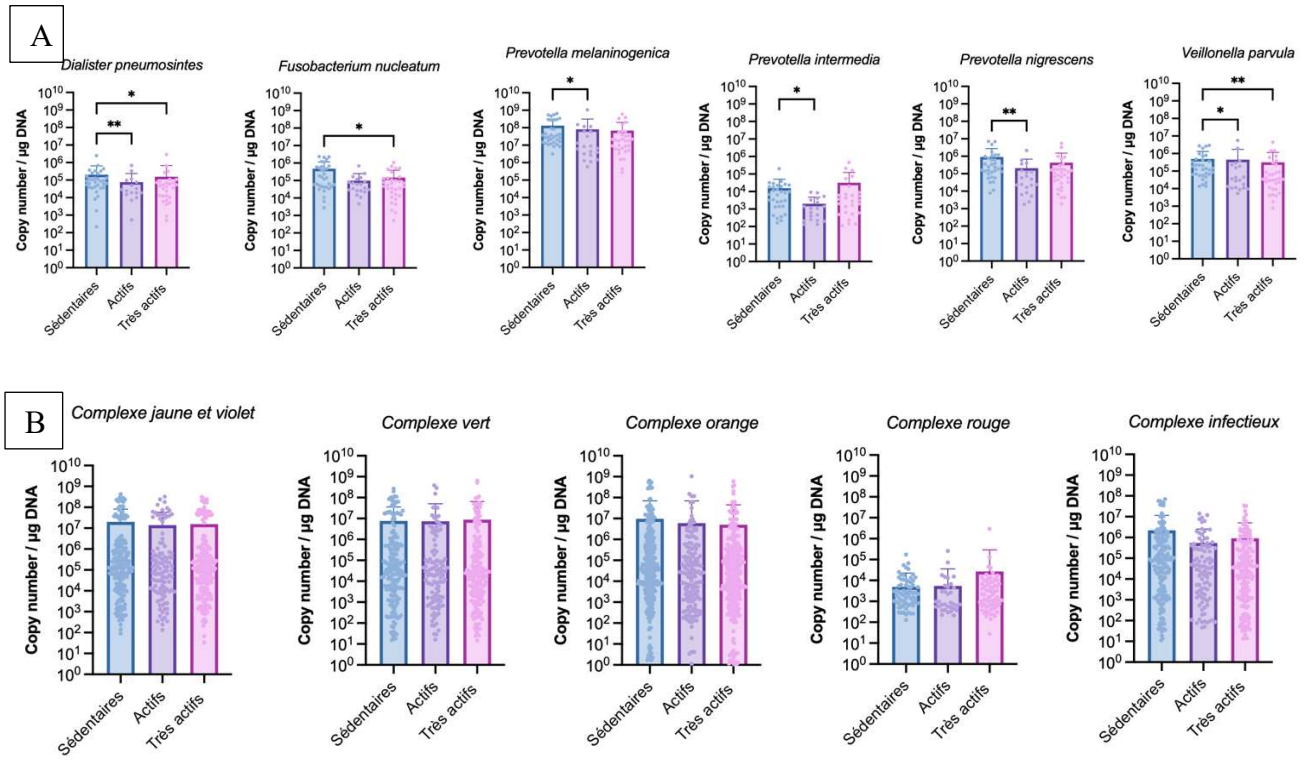


Figure 29 : Bactéries orales dont l'abondance salivaire diffère en fonction de la pratique d'activité physique d'endurance.

(A) Quantités moyennes (nombre de copies par µg d'ADN) des espèces bactériennes dont la présence salivaire est significativement différente selon les groupes d'activité physique. (B) Analyse des abondances microbiennes moyennes en fonction de leur appartenance à différents complexes bactériens (selon Socransky et le groupe de bactéries infectieuses). Les individus sont répartis en 3 groupes selon leur pratique de sport d'endurance : Sédentaires (n= 34), Actifs (n= 20), Très actifs (n= 32). Les comparaisons de moyennes intergroupes ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Chaque mesure représente la moyenne technique d'un quadruplicata expérimental. Les significativités des p-values utilisées par le logiciel Prism sont les suivantes : 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

Dans la heatmap présentée en Figure 28, *Dialister pneumosintes* est observée en forte abondance dans les trois groupes. Toutefois, l'analyse statistique complémentaire (Figure 29) révèle une concentration significativement plus élevée de cette bactérie chez les individus sédentaires par rapport aux personnes actives et très actives. Ce résultat est conforme aux données de la littérature, qui associent *D. pneumosintes* à d'autres pathogènes parodontaux, suggérant un rôle synergique dans la progression de la parodontite (Doan et al. 2000). Cette bactérie est souvent abondante dans les poches parodontales des patients atteints de cette maladie, faisant d'elle un marqueur potentiel de dysbiose du microbiote oral. Elle est également impliquée dans d'autres infections orales, telles que les infections endodontiques et les abcès dentaires. Cependant, la Figure 27 ne montre pas de différence notable dans la prévalence des maladies parodontales entre les trois groupes, ce qui suggère que la sédentarité pourrait favoriser l'augmentation de cette bactérie sans pour autant se traduire immédiatement par une hausse de la prévalence des maladies parodontales. En revanche, l'activité physique régulière semble maintenir cette bactérie à des niveaux contrôlés.

De même, *V. parvula* du complexe violet, ainsi que les 4 bactéries du complexe orange : *F. nucleatum*, *P. melaninogenica, P. intermedia* et *P. nigrescens,* ont des abondances salivaires plus faibles chez les individus qui pratiquent une activité physique régulière. Ces bactéries sont associées aux maladies parodontales et carieuses. La réduction de leur concentration chez les participants physiquement actifs suggère que l'activité physique régulière pourrait avoir un effet bénéfique sur la santé bucco-dentaire en réduisant les populations bactériennes impliquées dans ces pathologies.

Enfin, aucune différence significative entre les trois groupes n'est observée pour les différents complexes bactériens, bien que les bactéries du complexe rouge soient présentes en quantités relativement faibles par rapport aux autres complexes (Figure 29B). Cette observation est cohérente avec la littérature, qui associe les bactéries du complexe rouge à des formes avancées de maladies parodontales. La population de l'étude ORASPORT, étant globalement jeune et en bonne santé, ne

présente pas une prévalence élevée de ces stades de maladie, ce qui explique la faible abondance de ces bactéries dans les échantillons.

Ces résultats préliminaires suggèrent que la pratique régulière d’une activité physique pourrait avoir des effets modérateurs sur certaines espèces bactériennes présentes dans la salive, préférentiellement connues pour être associées aux maladies bucco-dentaires, et qu'une sédentarité accrue pourrait contribuer à un déséquilibre du microbiote oral.

3. Analyse de la composition microbienne des écouvillons gingivaux des participants

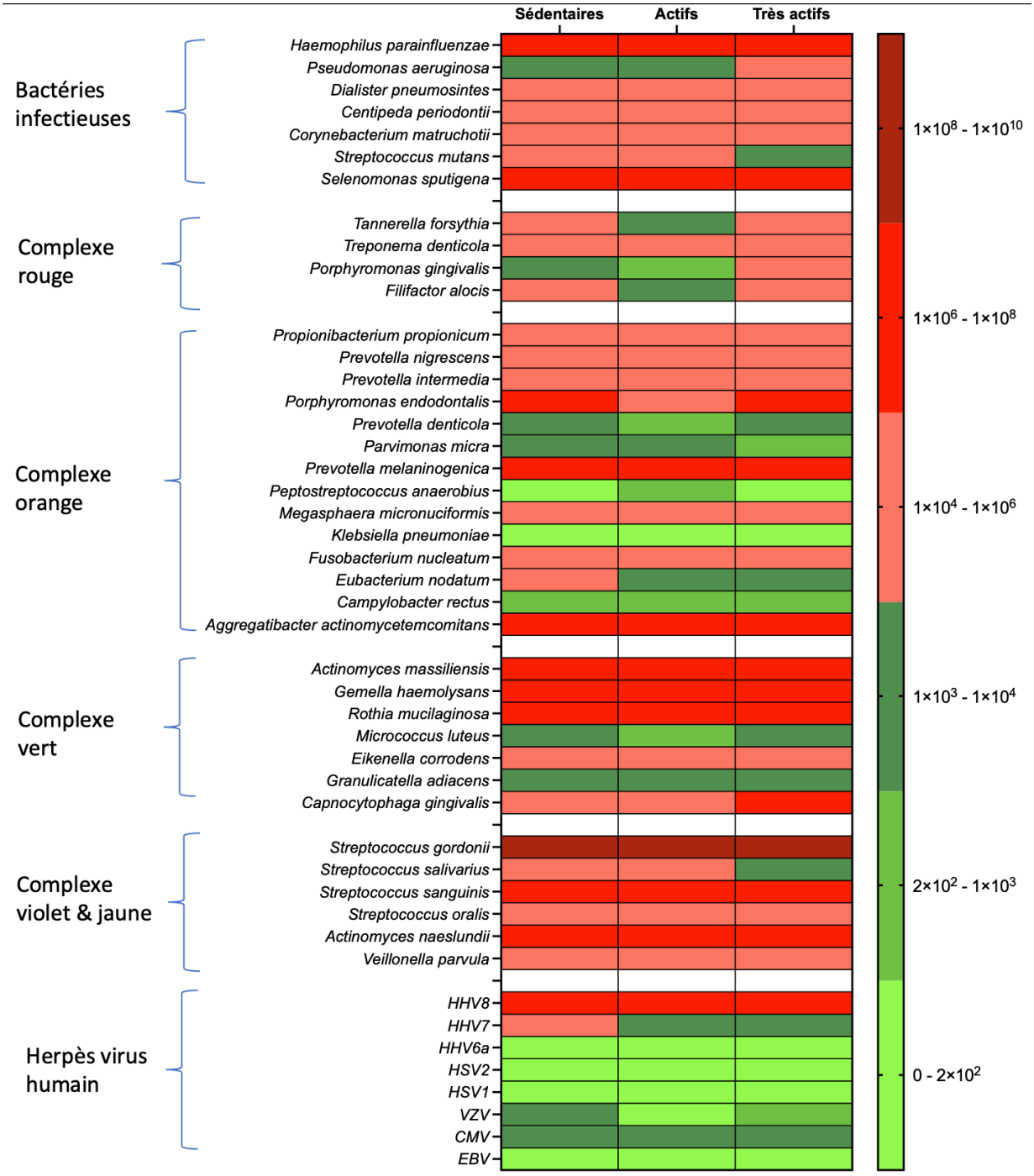


Figure 30 : Heatmap des quantifications moyennes de 48 espèces microbiennes dans les écouvillons gingivaux selon le niveau d'activité physique.

Cette heatmap illustre la quantification moyenne de 48 espèces microbiennes, exprimée en nombre de copies par µg d'ADN, mesurée grâce à la technologie Biomark™ HD dans les écouvillons gingivaux des participants de l'étude ORASPORT. Les groupes d'individus sont répartis selon leur niveau d'activité physique : sédentaires (n=34), actifs (n=20), et très actifs (n=32). Les espèces bactériennes

sont classées selon la théorie de Socransky, permettant une interprétation plus fine des interactions microbiennes en lien avec la pratique d'une activité physique d'endurance.

Dans la heatmap présentée en Figure 30, les bactéries des complexes violet et jaune de Socransky sont abondamment représentées dans les écouvillons gingivaux, avec une présence particulièrement marquée de *Streptococcus gordonii*. Toutefois, les abondances globales de ces bactéries restent stables entre les trois groupes étudiés, à l'exception notable de *Streptococcus salivarius,* dont la concentration diminue proportionnellement à l'augmentation de la fréquence des activités physiques d'endurance.

Concernant les bactéries du complexe vert, leur abondance est globalement élevée et homogène entre les groupes, hormis la bactérie *Capnocytophaga gingivalis,* dont sa concentration augmente chez les individus très actifs. En revanche, *Micrococcus luteus* et *Granulicatella adiacens* présentent une abondance légèrement inférieure à celles des autres bactéries de ce complexe.

Les bactéries du complexe orange présentent une répartition quantitative plus hétérogène. Par exemple, *P. endodontalis, P. melaninogenica* et *A. actinomycetemcomitans* sont nettement plus abondantes que les autres bactéries du même complexe. Certaines bactéries, telles que *P. anaerobius*, *K. pneumoniae* et *Campylobacter rectus,* sont présentes en quantités très faibles dans les écouvillons. Aucune différence significative dans la répartition de ces bactéries n'a été observée en fonction de l'activité physique, à l'exception d'*Eubacterium nodatum,* qui se révèle plus abondante chez les individus sédentaires.

Les bactéries du complexe rouge de Socransky, bien connues pour leur implication dans les maladies parodontales, sont également présentes dans les écouvillons, ce qui est cohérent avec leur localisation typique dans la plaque dentaire et les poches parodontales. *Treponema denticola* montre une stabilité de concentration indépendante de la fréquence d'activité physique pratiquée, tandis que *Porphyromonas gingivalis* tend à être plus abondante chez les participants très actifs. Il est intéressant de noter que la pratique régulière d'une activité physique semble moduler l'abondance de *Tannerella forsythia* et *Filifactor alocis*, qui se retrouvent en plus grande concentration chez les individus sédentaires et très actifs.

Parmi les bactéries infectieuses retrouvées en abondance dans les écouvillons, *Haemophilus parainfluenzae* et *Selenomonas sputigena* se distinguent. *H. parainfluenzae* est reconnue comme étant une bactérie pathogène opportuniste du microbiote oral, tandis que *S. sputigena* est bien documentée pour son rôle dans les maladies parodontales. Ces deux bactéries sont connues pour exacerber les dommages tissulaires en raison d'une réponse immunitaire inappropriée. L'activité physique semble

avoir peu d'effet sur la plupart des bactéries de ce complexe, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptococcus mutans*. *P. aeruginosa* est plus abondante chez les individus très actifs, tandis que *S. mutans* est davantage présente chez les participants sédentaires et actifs, comparativement aux très actifs.

Les résultats obtenus quant à la présence des 8 HHV dans les écouvillons prélevés à la jonction entre les dents et la gencive sont similaires à ceux observés dans les échantillons salivaires (Figure 28). En effet, les 8 HHV sont généralement peu abondants dans les échantillons, à l'exception notable de la détection HHV-8, dont on a démontré l'absence de fiabilité dans notre essai. On observe également la stabilité des niveaux de détection du CMV entre les trois groupes, tandis que HHV-7 et VZV montrent une diminution de leur quantité avec l'augmentation de l'activité physique.

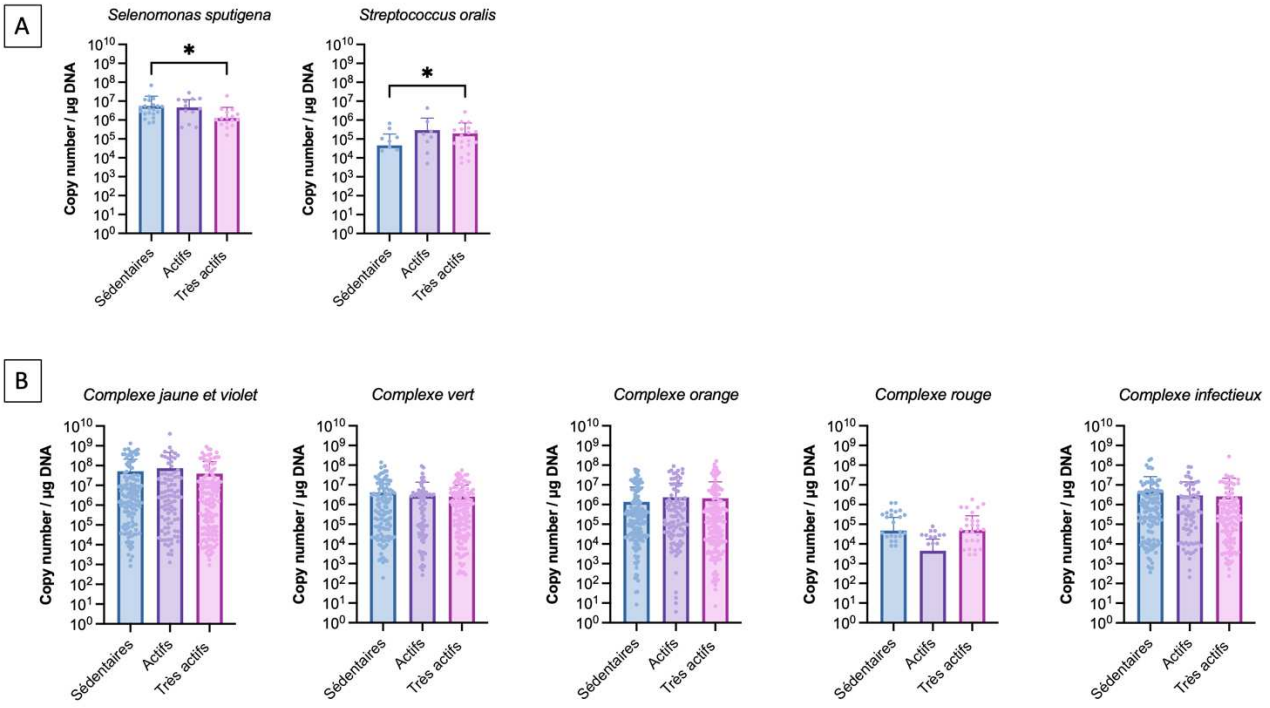


Figure 31 : Bactéries orales dont l'abondance diffère dans les écouvillons gingivaux en fonction de la pratique d'activité physique d'endurance.

(A) Quantités moyennes (nombre de copies par µg d'ADN) des espèces bactériennes présentant des différences significatives dans les écouvillons gingivaux selon les groupes d'activité physique. (B) Analyse des abondances microbiennes moyennes en fonction des complexes de Socransky et des bactéries infectieuses, et en lien avec le niveau d'activité physique. Les individus sont répartis en 3 groupes selon leur pratique de sport d'endurance : Sédentaires (n= 34), Actifs (n= 20), Très actifs (n= 32). Les comparaisons de moyennes intergroupes ont été effectuées à l'aide du test non

paramétrique de Kruskal-Wallis. Chaque mesure représente la moyenne technique d'un quadruplicata expérimental. Les significativités des p-values utilisées par le logiciel Prism sont les suivantes : 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

En complément de la heatmap (Figure 31), des analyses statistiques ont été réalisées pour comparer, pour chaque bactérie, le nombre de copies par µg d'ADN en fonction de la fréquence d'activité physique d'endurance pratiquée. Ces analyses ont révélé que seulement deux bactéries présentaient des différences significatives entre les trois groupes. D'une part, *Selenomas sputigena* est retrouvée en plus grande quantité chez les participants sédentaires par rapport aux individus très actifs (Figure 31A), suggérant que la pratique sportive intense pourrait moduler la concentration de cette bactérie, potentiellement pathogène pour le microbiote oral. D'autre part, *Streptococcus oralis*, une bactérie commensale, est plus abondante chez les participants très actifs. Bien que *S. oralis* joue un rôle essentiel dans l'équilibre du microbiote oral, elle peut également être impliquée dans le développement de caries dentaires. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'activité physique intense pourrait avoir un effet bénéfique sur la régulation du microbiote oral pour ces deux espèces bactériennes.

En dehors d'une diminution des bactéries du complexe rouge comparée aux autres complexes, la Figure 31B ne montre pas de différences significatives concernant les autres complexes bactériens.

4. Comparaison de deux types de prélèvements : salives et écouvillons gingivaux

Nous avons cherché à déterminer si la composition du microbiote oral variait en fonction du type de prélèvement effectué. Pour cela, une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) a été réalisée, dont les résultats sont présentés dans la Figure 32. Ces résultats apportent des informations nouvelles, à la fois sur la comparaison entre les deux types d'échantillons (crachats salivaires et écouvillons) et sur l'influence de la fréquence des activités physiques d'endurance.

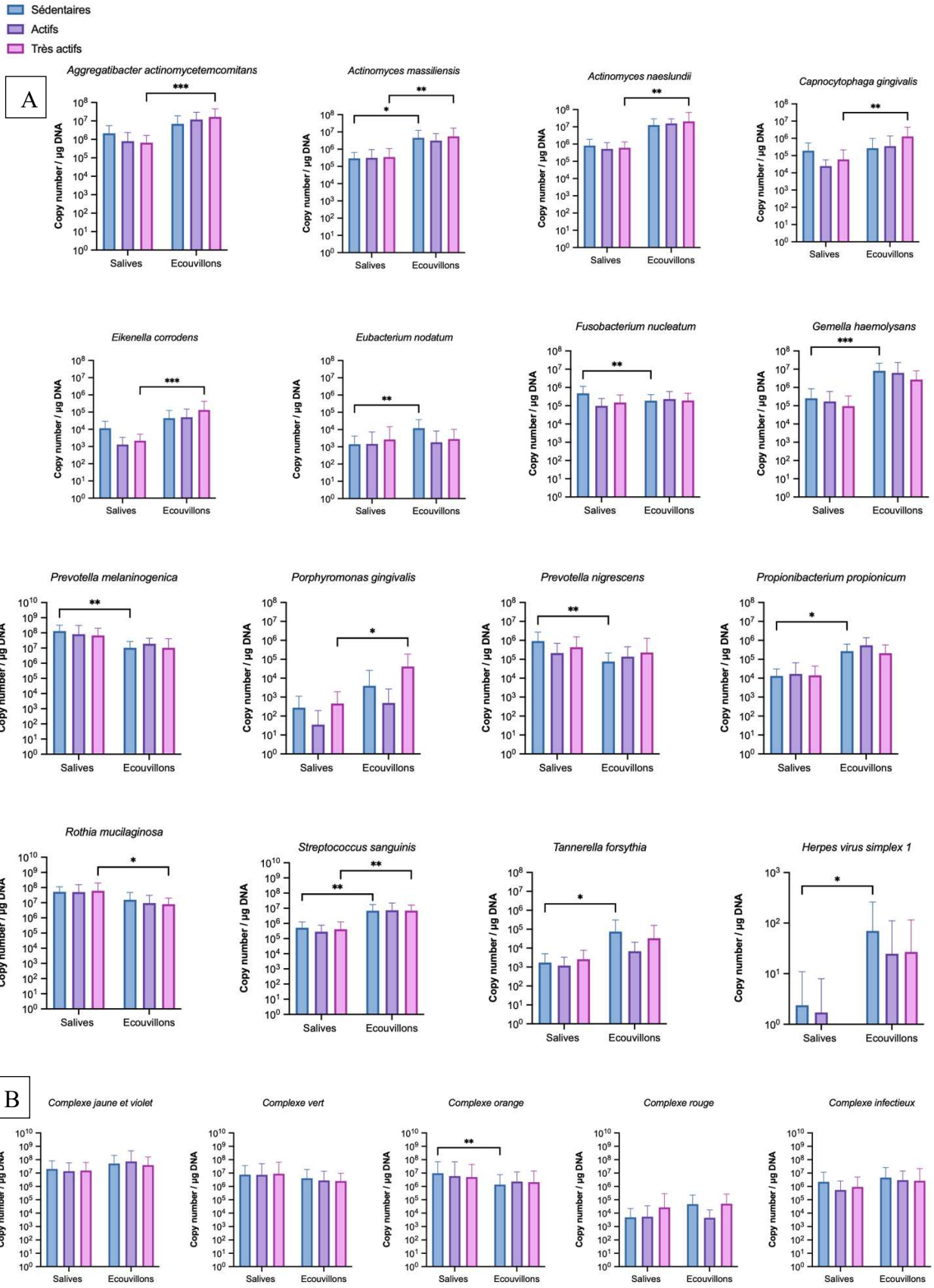

Sédentaires
Actifs
Très actifs
A
Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Actinomyces massiliensis
Actinomyces naeslundii
Capnocytophaga gingivalis
Eikenella corrodens
Eubacterium nodatum
Fusobacterium nucleatum
Gemella haemolysans
Prevotella melaninogenica
Porphyromonas gingivalis
Prevotella nigrescens
Propionibacterium propionicum
Rothia mucilaginosa
Streptococcus sanguinis
Tannerella forsythia
Herpes virus simplex 1
B
Complexe jaune et violet
Complexe vert
Complexe orange
Complexe rouge
Complexe infectieux
Copy number / µg DNA
Salives
Ecouvillons

Figure 32 : Comparaison de l'abondance des différentes espèces entre les prélèvements salivaires et les écouvillons gingivaux en fonction du niveau d'activité physique.

(A) Comparaison des quantités moyennes (nombre de copies par µg d'ADN) des espèces microbiennes présentant des différences significatives entre les prélèvements de salives (n= 86) et les écouvillons gingivaux (n= 86) en fonction des groupes d'activité physique. (B) Analyse des abondances microbiennes moyennes en lien avec les complexes de Socransky et les bactéries infectieuses, selon le niveau d'activité physique. Les participants sont répartis en trois groupes selon leur pratique de sport d'endurance : Sédentaires (n= 34), Actifs (n= 20), Très actifs (n= 32). Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) a été réalisée pour comparer les moyennes entre les différentes conditions expérimentales, permettant d'évaluer l'impact des types d'échantillons salivaires et du niveau d'endurance physique sur la quantité de micro-organismes détectés. Chaque mesure représente la moyenne technique d'un quadruplicata expérimental. Les significativités des p-values utilisées par le logiciel Prism sont les suivantes : 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

Dans la Figure 32A, nous observons que certaines bactéries sont plus abondantes dans la salive que dans les écouvillons, et inversement. Chez les participants sédentaires, les bactéries *F. nucleatum, P. melaninogenica* et *P. nigrescens,* toutes appartenant au complexe orange de Socransky, sont retrouvées en plus grande quantité dans la salive. Ces bactéries, bien connues pour leur rôle dans l'évolution des maladies parodontales, semblent favorisées par la sédentarité. Cette hypothèse est renforcée par les résultats présentés dans la Figure 32B, qui révèlent une différence statistiquement significative dans l'abondance du complexe orange chez les participants sédentaires.

À l'inverse, *R. mucilaginosa*, une bactérie du complexe vert reconnue pour ses propriétés bénéfiques, est retrouvée en plus grande quantité dans la salive des participants très actifs par rapport aux écouvillons. Cela suggère que l'activité physique d'endurance intense pourrait favoriser la prolifération de cette bactérie commensale dans le microbiote oral.

Certaines bactéries, telles que *S. sanguinis*, *G. haemolysans*, *A. massiliensis*, *E. nodatum*, *P. propionicum*, *T. forsythia*, ainsi que HSV-1, sont davantage présentes dans les écouvillons que dans la salive chez les participants sédentaires. Ces micro-organismes se répartissent au sein de plusieurs complexes de Socransky. Chez les participants pratiquant une activité physique intense, les écouvillons révèlent une augmentation de bactéries telles que *A. naeslundii, S. sanguinis, A. massiliensis, C. gingivalis, E. corrodens, A. actinomycetemcomitans* et *P. gingivalis,* par rapport à la salive. À l'exception des deux dernières, qui appartiennent aux complexes orange et rouge, cette augmentation concerne principalement les bactéries des complexes jaune et vert, connus pour abriter des espèces commensales du microbiote oral. Ces observations suggèrent que la pratique intensive d'activités

d'endurance pourrait avoir un effet bénéfique sur la composition du microbiote oral, en particulier dans les écouvillons.

VI. Conclusion et perspectives

Ces résultats préliminaires mettent en évidence des différences significatives dans la composition du microbiote oral en fonction du type de prélèvement (salive ou écouvillon gingival). De plus, la pratique d'une activité physique d'endurance intense semble avoir un effet bénéfique sur la composition du microbiote oral. En effet, une diminution significative de certaines bactéries pouvant être impliquées dans les pathologies orales, notamment les bactéries du complexe orange et les bactéries infectieuses, a été observée chez les individus très actifs. Ces résultats laissent à penser que l'activité physique pourrait jouer un rôle préventif dans la santé bucco-dentaire.

L'étude ORASPORT, qui se poursuivra jusqu'en septembre 2025, permettra d'acquérir de nouvelles données qui viendront consolider ces conclusions préliminaires. Dans le prolongement de ce travail, nous chercherons à identifier des « signatures microbiennes » en associant la présence de bactéries, de virus, et de marqueurs inflammatoires. Ce volet est mené en collaboration avec Margaux Dubois, qui travaille sur la quantification des marqueurs inflammatoires au sein de la cohorte de ORASPORT. L'objectif sera de mettre en évidence des profils spécifiques du microbiote oral en fonction du niveau d'activité physique d'endurance exercé.

En parallèle, des analyses multivariées seront réalisées en collaboration avec le Département de Santé publique du CHU de Nice. Ces analyses intègreront les résultats de quantification du microbiote oral, ainsi que les données issues des questionnaires (annexes), afin d'explorer plus en profondeur les interactions entre l'activité physique et la composition du microbiote oral. Ces approches globales permettront une meilleure compréhension du lien entre endurance physique et santé bucco-dentaire, un domaine encore peu exploré.

Références bibliographiques

Abranches, J, L Zeng, JK Kajfasz, SR Palmer, B Chakraborty, ZT Wen, VP Richards, LJ Brady, and JA Lemos. 2018. "Biology of Oral Streptococci." *Microbiology Spectrum* 6 (5): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042–2018. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.

Aja, E., M. Mangar, H.M. Fletcher, and A. Mishra. 2021. "Filifactor Alocis: Recent Insights and Advances." *Journal of Dental Research* 100 (8): 790–97. https://doi.org/10.1177/00220345211000656.

Almeida, Anna Paula Costa Ponte Sousa Carvalho, Nathalia Carolina Fernandes Fagundes, Lucianne Cople Maia, and Rafael Rodrigues Lima. 2017. "Is There An Association Between Periodontitis And Atherosclerosis In Adults? A Systematic Review." *Current Vascular Pharmacology*, August. https://doi.org/10.2174/1570161115666170830141852.

Ashley, P., A. Di Iorio, E. Cole, A. Tanday, and I. Needleman. 2015. "Oral Health of Elite Athletes and Association with Performance: A Systematic Review." *British Journal of Sports Medicine* 49 (1): 14–19. https://doi.org/10.1136/bjsports-2014-093617.

Ashraf, Ghulam M., Vadim V. Tarasov, Alfiya Makhmutova, Vladimir N. Chubarev, Marco Avila-Rodriguez, Sergey O. Bachurin, and Gjumrakch Aliev. 2019. "The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease." *Molecular Neurobiology* 56 (6): 4479–91. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1388-y.

Bartold, Peter Mark, and Isabel Lopez-Oliva. 2020. "Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: An Update 2012-2017." *Periodontology 2000* 83 (1): 189–212. https://doi.org/10.1111/prd.12300.

Baunwall, Simon Mark Dahl, Mads Ming Lee, Marcel Kjærsgaard Eriksen, Benjamin H. Mullish, Julian R. Marchesi, Jens Frederik Dahlerup, and Christian Lodberg Hvas. 2020. "Faecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridioides Difficile* Infection: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis." *EClinicalMedicine* 29–30 (December):100642. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100642.

Bernabe, E., W. Marcenes, C.R. Hernandez, J. Bailey, L.G. Abreu, V. Alipour, S. Amini, et al. 2020. "Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study." *Journal of Dental Research* 99 (4): 362–73. https://doi.org/10.1177/0022034520908533.

Bougault, Valérie, Paolo Emilio Adami, Nicola Sewry, Ken Fitch, Christopher Carlsten, Beat Villiger, Martin Schwellnus, and Wolfgang Schobersberger. 2022. “Environmental Factors Associated with Non-Infective Acute Respiratory Illness in Athletes: A Systematic Review by a Subgroup of the IOC Consensus Group on ‘Acute Respiratory Illness in the Athlete.’” *Journal of Science and Medicine in Sport* 25 (6): 466–73. https://doi.org/10.1016/j.jsams.2022.03.003.

Bourgeois, D., P. Bouchard, and C. Mattout. 2007. “Epidemiology of Periodontal Status in Dentate Adults in France, 2002-2003.” *Journal of Periodontal Research* 42 (3): 219–27. https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00936.x.

Bui, Fiona Q., Cassio Luiz Coutinho Almeida-da-Silva, Brandon Huynh, Alston Trinh, Jessica Liu, Jacob Woodward, Homer Asadi, and David M. Ojcius. 2019. “Association between Periodontal Pathogens and Systemic Disease.” *Biomedical Journal* 42 (1): 27–35. https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001.

Case, Rebecca J., Yan Boucher, Ingela Dahllöf, Carola Holmström, W. Ford Doolittle, and Staffan Kjelleberg. 2007. “Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies.” *Applied and Environmental Microbiology* 73 (1): 278–88. https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06.

Chen, T., P. D. Marsh, and N. N. Al-Hebshi. 2022. “SMDI: An Index for Measuring Subgingival Microbial Dysbiosis.” *Journal of Dental Research* 101 (3): 331–38. https://doi.org/10.1177/00220345211035775.

Chen, Yu-Pei, Anthony T. C. Chan, Quynh-Thu Le, Pierre Blanchard, Ying Sun, and Jun Ma. 2019. “Nasopharyngeal Carcinoma.” *Lancet (London, England)* 394 (10192): 64–80. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30956-0.

Christfort, Juliane Fjelrad, Morgane Ortis, Hau Van Nguyen, Robert Marsault, and Alain Doglio. 2024. “Centrifugal Microfluidic Cell Culture Platform for Physiologically Relevant Virus Infection Studies: A Case Study with HSV-1 Infection of Periodontal Cells.” *Biosensors* 14 (8): 401. https://doi.org/10.3390/bios14080401.

Cochran, David L. 2008. “Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease.” *Journal of Periodontology* 79 (8 Suppl): 1569–76. https://doi.org/10.1902/jop.2008.080233.

Contreras, A., and J. Slots. 2000. “Herpesviruses in Human Periodontal Disease.” *Journal of Periodontal Research* 35 (1): 3–16. https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2000.035001003.x.

Cosgarea, Raluca, Roxana Tristiu, Raluca Bianca Dumitru, Nicole Birgit Arweiler, Simona Rednic, Cristina Ioana Sirbu, Liana Lascu, Anton Sculean, and Sigrun Eick. 2018. “Effects of Non-Surgical Periodontal Therapy on Periodontal Laboratory and Clinical Data as Well as on Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis.” *Clinical Oral Investigations*, March. https://doi.org/10.1007/s00784-018-2420-3.

Dawson, Dolphus R., Chunmei Wang, Robert J. Danaher, Yushun Lin, Richard J. Kryscio, Robert J. Jacob, and Craig S. Miller. 2009. “Real-Time Polymerase Chain Reaction to Determine the Prevalence and Copy Number of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus DNA in Subgingival Plaque at Individual Healthy and Periodontal Disease Sites.” *Journal of Periodontology* 80 (7): 1133–40. https://doi.org/10.1902/jop.2009.080644.

Dethlefsen, Les, Margaret McFall-Ngai, and David A. Relman. 2007. “An Ecological and Evolutionary Perspective on Human-Microbe Mutualism and Disease.” *Nature* 449 (7164): 811–18. https://doi.org/10.1038/nature06245.

Dioguardi, Mario, Vito Crincoli, Luigi Laino, Mario Alovisi, Diego Sovereto, Filiberto Mastrangelo, Lucio Lo Russo, and Lorenzo Lo Muzio. 2020. “The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer’s Disease: A Systematic Review.” *Journal of Clinical Medicine* 9 (2). https://doi.org/10.3390/jcm9020495.

Doan, N., A. Contreras, J. Flynn, J. Slots, and C. Chen. 2000. “Molecular Identification of Dialister Pneumosintes in Subgingival Plaque of Humans.” *Journal of Clinical Microbiology* 38 (8): 3043–47. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87182/.

Dong, Jiajia, Wei Li, Qi Wang, Jiahao Chen, Yue Zu, Xuedong Zhou, and Qiang Guo. 2022. “Relationships Between Oral Microecosystem and Respiratory Diseases.” *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (January):718222. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.718222.

Dubois, Margaux, Agathe Deroche, Morgane Ortis, and Marie-France Bertrand. 2024. “Santé orale et performances sportives : les spécificités de la prise en charge du patient-athlète.” L’Information Dentaire. July 1, 2024. https://www.information-dentaire.fr/formations/sante-orale-et-performances-sportives-les-specificites-de-la-prise-en-charge-du-patient-athlete/.

Dubois, Margaux, Morgane Ortis, Alain Doglio, and Valérie Bougault. 2024. “Microbiote Oral et Santé Bucco-Dentaire Des Sportifs : Revue Narrative.” *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, Numéro thématique : La nutrition du sportif, 59 (4): 233–42. https://doi.org/10.1016/j.cnd.2024.03.005.

Eke, Paul I., Bruce A. Dye, Liang Wei, Gary D. Slade, Gina O. Thornton-Evans, Wenche S. Borgnakke, George W. Taylor, Roy C. Page, James D. Beck, and Robert J. Genco. 2015. “Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012.” *Journal of Periodontology* 86 (5): 611–22. https://doi.org/10.1902/jop.2015.140520.

Esberg, Anders, Angela Barone, Linda Eriksson, Pernilla Lif Holgerson, Susann Teneberg, and Ingegerd Johansson. 2020. “Corynebacterium Matruchotii Demography and Adhesion Determinants in the Oral Cavity of Healthy Individuals.” *Microorganisms* 8 (11): 1780. https://doi.org/10.3390/microorganisms8111780.

Figuero, Elena, Yiping W. Han, and Yasushi Furuichi. 2020. “Periodontal Diseases and Adverse Pregnancy Outcomes: Mechanisms.” *Periodontology 2000* 83 (1): 175–88. https://doi.org/10.1111/prd.12295.

Genco, Robert J., and Mariano Sanz. 2020. “Clinical and Public Health Implications of Periodontal and Systemic Diseases: An Overview.” *Periodontology 2000* 83 (1): 7–13. https://doi.org/10.1111/prd.12344.

Griffen, Ann L., Clifford J. Beall, James H. Campbell, Noah D. Firestone, Purnima S. Kumar, Zamin K. Yang, Mircea Podar, and Eugene J. Leys. 2012. “Distinct and Complex Bacterial Profiles in Human Periodontitis and Health Revealed by 16S Pyrosequencing.” *The ISME Journal* 6 (6): 1176–85. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.191.

Hajishengallis, George. 2015. “Periodontitis: From Microbial Immune Subversion to Systemic Inflammation.” *Nature Reviews. Immunology* 15 (1): 30–44. https://doi.org/10.1038/nri3785.

“Herpes Virus Humains :: Microorganismes :: ePOPI.” n.d. Accessed May 13, 2024. https://epopi.fr/?cat_id=1492&tk=66730d82444338dfb7cc51de52338866.

“Herpesviruses Overview: Structure, Classification, Transmission, Treatment.” n.d. CUSABIO. Accessed September 29, 2024. https://www.cusabio.com/infectious-diseases/herpesviruses.html.

Inchingolo, Alessio Danilo, Giuseppina Malcangi, Alexandra Semjonova, Angelo Michele Inchingolo, Assunta Patano, Giovanni Coloccia, Sabino Ceci, et al. 2022. “Oralbiotica/Oralbiotics: The Impact of Oral Microbiota on Dental Health and Demineralization: A Systematic Review of the Literature.” *Children* 9 (7): 1014. https://doi.org/10.3390/children9071014.

Janati, Amal Idrissi, Igor Karp, Claudie Laprise, Hisham Sabri, and Elham Emami. 2020. “Detection of Fusobacterium Nucleatum in Feces and Colorectal Mucosa as a Risk Factor for Colorectal Cancer:

A Systematic Review and Meta-Analysis." *Systematic Reviews* 9 (1): 276. https://doi.org/10.1186/s13643-020-01526-z.

Jong, T. de, A. D. Bakker, V. Everts, and T. H. Smit. 2017. "The Intricate Anatomy of the Periodontal Ligament and Its Development: Lessons for Periodontal Regeneration." *Journal of Periodontal Research* 52 (6): 965–74. https://doi.org/10.1111/jre.12477.

Kato, Ayako, Kenichi Imai, Kuniyasu Ochiai, and Yorimasa Ogata. 2015. "Prevalence and Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus DNA and Porphyromonas Gingivalis Associated with Japanese Chronic Periodontitis Patients." *Clinical Oral Investigations* 19 (7): 1605–10. https://doi.org/10.1007/s00784-014-1387-y.

Kistler, James O., Veronica Booth, David J. Bradshaw, and William G. Wade. 2013. "Bacterial Community Development in Experimental Gingivitis." Edited by Michael Glogauer. *PLoS ONE* 8 (8): e71227. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071227.

Kolenbrander, Paul E., Robert J. Palmer, Saravanan Periasamy, and Nicholas S. Jakubovics. 2010. "Oral Multispecies Biofilm Development and the Key Role of Cell–Cell Distance." *Nature Reviews Microbiology* 8 (7): 471–80. https://doi.org/10.1038/nrmicro2381.

Kukhanova, M. K., A. N. Korovina, and S. N. Kochetkov. 2014. "Human Herpes Simplex Virus: Life Cycle and Development of Inhibitors." *Biochemistry. Biokhimiia* 79 (13): 1635–52. https://doi.org/10.1134/S0006297914130124.

"La Revue Des Microbiotes N°8 : Parondontite & Maladies." n.d. Accessed September 30, 2024. https://www.larevuedesmicrobiotes.fr/numeros/parodontite-et-maladies-cardio-metaboliques.

Lalla, Evanthia, and Panos N. Papapanou. 2011. "Diabetes Mellitus and Periodontitis: A Tale of Two Common Interrelated Diseases." *Nature Reviews. Endocrinology* 7 (12): 738–48. https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.106.

Lau, Susanna K. P., Jade L. L. Teng, Chi-Chun Ho, and Patrick C. Y. Woo. 2015. "Chapter 12 - Gene Amplification and Sequencing for Bacterial Identification." In *Methods in Microbiology*, edited by Andrew Sails and Yi-Wei Tang, 42:433–64. Current and Emerging Technologies for the Diagnosis of Microbial Infections. Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.04.003.

Lee, Wei-Cheng, Earl Fu, Chung-Hsing Li, Ren-Yeong Huang, Hsien-Chung Chiu, Wan-Chien Cheng, and Wei-Liang Chen. 2020. "Association between Periodontitis and Pulmonary Function Based on the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)." *Journal of*

Clinical Periodontology, May. https://doi.org/10.1111/jcpe.13303.

Leite, Fábio R. M., Gustavo G. Nascimento, Flemming Scheutz, and Rodrigo López. 2018. "Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Regression." *American Journal of Preventive Medicine* 54 (6): 831–41. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.02.014.

Lewinski, Michael A., Kevin Alby, N. Esther Babady, Susan M. Butler-Wu, Jennifer Dien Bard, Alexander L. Greninger, Kimberly Hanson, et al. 2023. "Exploring the Utility of Multiplex Infectious Disease Panel Testing for Diagnosis of Infection in Different Body Sites: A Joint Report of the Association for Molecular Pathology, American Society for Microbiology, Infectious Diseases Society of America, and Pan American Society for Clinical Virology." *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 25 (12): 857–75. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2023.08.005.

Loos, Bruno G. 2016. "Periodontal Medicine: Work in Progress!" *Journal of Clinical Periodontology* 43 (6): 470–71. https://doi.org/10.1111/jcpe.12550.

Lövheim, Hugo, Jan Olsson, Bodil Weidung, Anders Johansson, Sture Eriksson, Göran Hallmans, and Fredrik Elgh. 2018. "Interaction between Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Type 1 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease Development." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 61 (3): 939–45. https://doi.org/10.3233/JAD-161305.

Marsh, Philip D. 2009. "Dental Plaque as a Biofilm: The Significance of pH in Health and Caries." *Compendium of Continuing Education in Dentistry (Jamesburg, N.J.: 1995)* 30 (2): 76–78, 80, 83–87; quiz 88, 90.

Martin-Cabezas, Rodrigo, Narendra Seelam, Catherine Petit, Kévimy Agossa, Sébastien Gaertner, Henri Tenenbaum, Jean-Luc Davideau, and Olivier Huck. 2016. "Association between Periodontitis and Arterial Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis." *American Heart Journal* 180 (October):98–112. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2016.07.018.

Metwaly, Amira, Sandra Reitmeier, and Dirk Haller. 2022. "Microbiome Risk Profiles as Biomarkers for Inflammatory and Metabolic Disorders." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 19 (6): 383–97. https://doi.org/10.1038/s41575-022-00581-2.

Meuric, Vincent, Sandrine Le Gall-David, Emile Boyer, Luis Acuña-Amador, Bénédicte Martin, Shao Bing Fong, Frederique Barloy-Hubler, and Martine Bonnaure-Mallet. 2017. "Signature of Microbial Dysbiosis in Periodontitis." *Applied and Environmental Microbiology* 83 (14): e00462-17. https://doi.org/10.1128/AEM.00462-17.

Naginyte, Monika, Thuy Do, Josephine Meade, Deirdre Ann Devine, and Philip David Marsh. 2019. "Enrichment of Periodontal Pathogens from the Biofilms of Healthy Adults." *Scientific Reports* 9 (April):5491. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41882-y.

Neves, Beatriz Gonçalves, Rafael Nóbrega Stipp, Daniela da Silva Bezerra, Sarah Florindo de Figueiredo Guedes, and Lidiany Karla Azevedo Rodrigues. 2018. "Quantitative Analysis of Biofilm Bacteria According to Different Stages of Early Childhood Caries." *Archives of Oral Biology* 96 (December):155–61. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.09.007.

Oksenhendler, Eric, David Boutboul, and Lionel Galicier. 2019. "Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus/Human Herpesvirus 8-Associated Lymphoproliferative Disorders." *Blood* 133 (11): 1186–90. https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-852442.

Olivieri, Charles V., Hélène Raybaud, Lilit Tonoyan, Sarah Abid, Robert Marsault, Marlène Chevalier, Alain Doglio, and Séverine Vincent-Bugnas. 2020. "Epstein-Barr Virus-Infected Plasma Cells in Periodontitis Lesions." *Microbial Pathogenesis* 143 (June):104128. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104128.

Olwagen, Courtney P., Peter V. Adrian, and Shabir A. Madhi. 2019. "Performance of the Biomark HD Real-Time qPCR System (Fluidigm) for the Detection of Nasopharyngeal Bacterial Pathogens and Streptococcus Pneumoniae Typing." *Scientific Reports* 9 (1): 6494. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42846-y.

Ortis, Morgane, Marlène Chevalier, Charles-Vivien Olivieri, Sébastien Vitale, Adrien Paul, Lilit Tonoyan, Alain Doglio, and Robert Marsault. 2024. "Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Human Periodontal Ligament." *International Journal of Molecular Sciences* 25 (15): 8466. https://doi.org/10.3390/ijms25158466.

Page, R. C., and K. S. Kornman. 1997. "The Pathogenesis of Human Periodontitis: An Introduction." *Periodontology 2000* 14 (June):9–11.

Park, Chan Ho, Kyoung-Hwa Kim, Yong-Moo Lee, and Yang-Jo Seol. 2016. "Advanced Engineering Strategies for Periodontal Complex Regeneration." *Materials* 9 (1). https://doi.org/10.3390/ma9010057.

Petersen, Charisse, and June L. Round. 2014. "Defining Dysbiosis and Its Influence on Host Immunity and Disease." *Cellular Microbiology* 16 (7): 1024–33. https://doi.org/10.1111/cmi.12308.

Podglajen, I, and J Mainardi. 2007. "Apport des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic

des endocardites infectieuses." *Réanimation* 16 (3): 193–99. https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.03.001.

Rickinson, A. B. 2014. "Co-Infections, Inflammation and Oncogenesis: Future Directions for EBV Research." *Seminars in Cancer Biology* 26 (June):99–115. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.004.

Rosier, B. T., P. D. Marsh, and A. Mira. 2018. "Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis." *Journal of Dental Research* 97 (4): 371–80. https://doi.org/10.1177/0022034517742139.

Routy, Bertrand, Vancheswaran Gopalakrishnan, Romain Daillère, Laurence Zitvogel, Jennifer A. Wargo, and Guido Kroemer. 2018. "The Gut Microbiota Influences Anticancer Immunosurveillance and General Health." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 15 (6): 382–96. https://doi.org/10.1038/s41571-018-0006-2.

Sabharwal, Amarpreet, Isaac S. Gomes-Filho, Elizabeth Stellrecht, and Frank A. Scannapieco. 2018. "Role of Periodontal Therapy in Management of Common Complex Systemic Diseases and Conditions: An Update." *Periodontology 2000* 78 (1): 212–26. https://doi.org/10.1111/prd.12226.

Sanz, Mariano, David Beighton, Michael A. Curtis, Jaime A. Cury, Irene Dige, Henrik Dommisch, Roger Ellwood, et al. 2017. "Role of Microbial Biofilms in the Maintenance of Oral Health and in the Development of Dental Caries and Periodontal Diseases. Consensus Report of Group 1 of the Joint EFP/ORCA Workshop on the Boundaries between Caries and Periodontal Disease." *Journal of Clinical Periodontology* 44 Suppl 18:S5–11. https://doi.org/10.1111/jcpe.12682.

Scherz, Valentin, Gilbert Greub, and Claire Bertelli. 2022. "Building up a Clinical Microbiota Profiling: A Quality Framework Proposal." *Critical Reviews in Microbiology* 48 (3): 356–75. https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1975642.

Schlafer, Sebastian, Birgit Riep, Ann L. Griffen, Annett Petrich, Julia Hübner, Moritz Berning, Anton Friedmann, Ulf B. Göbel, and Annette Moter. 2010. "Filifactor Alocis - Involvement in Periodontal Biofilms." *BMC Microbiology* 10 (1): 66. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-66.

Schloss, Patrick D., and Jo Handelsman. 2005. "Metagenomics for Studying Unculturable Microorganisms: Cutting the Gordian Knot." *Genome Biology* 6 (8): 229. https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-229.

Shannon-Lowe, Claire, Alan B. Rickinson, and Andrew I. Bell. 2017. "Epstein-Barr Virus-Associated

Lymphomas." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 372 (1732). https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0271.

Simpson, Richard J., John P. Campbell, Maree Gleeson, Karsten Krüger, David C. Nieman, David B. Pyne, James E. Turner, and Neil P. Walsh. 2020. "Can Exercise Affect Immune Function to Increase Susceptibility to Infection?" *Exercise Immunology Review* 26:8–22.

Slots, Jørgen. 2007. "Herpesviral-Bacterial Synergy in the Pathogenesis of Human Periodontitis." *Current Opinion in Infectious Diseases* 20 (3): 278–83. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3280964da0.

Slots, Jørgen. 2015. "Periodontal Herpesviruses: Prevalence, Pathogenicity, Systemic Risk." *Periodontology 2000* 69 (1): 28–45. https://doi.org/10.1111/prd.12085.

Slots, Jørgen, and Henrik Slots. 2019. "Periodontal Herpesvirus Morbidity and Treatment." *Periodontology 2000* 79 (1): 210–20. https://doi.org/10.1111/prd.12241.

Socransky, S. S., and A. D. Haffajee. 1992. "The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts." *Journal of Periodontology* 63 (4 Suppl): 322–31. https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.4s.322.

Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith, and R. L. Kent. 1998. "Microbial Complexes in Subgingival Plaque." *Journal of Clinical Periodontology* 25 (2): 134–44. https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x.

Thier, Katharina, Philipp Petermann, Elena Rahn, Daniel Rothamel, Wilhelm Bloch, and Dagmar Knebel-Mörsdorf. 2017. "Mechanical Barriers Restrict Invasion of Herpes Simplex Virus 1 into Human Oral Mucosa." *Journal of Virology* 91 (22): e01295-17. https://doi.org/10.1128/JVI.01295-17.

Tonetti, Maurizio S., Søren Jepsen, Lijian Jin, and Joan Otomo-Corgel. 2017. "Impact of the Global Burden of Periodontal Diseases on Health, Nutrition and Wellbeing of Mankind: A Call for Global Action." *Journal of Clinical Periodontology* 44 (5): 456–62. https://doi.org/10.1111/jcpe.12732.

Tonetti, Maurizio S., Thomas E. Van Dyke, and working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. 2013. "Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Consensus Report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases." *Journal of Periodontology* 84 (4 Suppl): S24-29. https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340019.

Tonoyan, Lilit, Charles V. Olivieri, Marlène Chevalier, Robert Marsault, and Alain Doglio. 2024.

"Detection of Epstein-Barr Virus Infection in Primary Junctional Epithelial Cell Cultures." *Journal of Oral Microbiology* 16 (1): 2301199. https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2301199.

Tonoyan, Lilit, Séverine Vincent-Bugnas, Charles-Vivien Olivieri, and Alain Doglio. 2019. "New Viral Facets in Oral Diseases: The EBV Paradox." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (23): 5861. https://doi.org/10.3390/ijms20235861.

"Tooth Decay." 2024. In *Wikipedia*. https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Tooth_decay&oldid=1232501274.

Valm, Alex M. 2019. "The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease." *Journal of Molecular Biology* 431 (16): 2957–69. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.016.

Van Dyke, Thomas E., P. Mark Bartold, and Eric C. Reynolds. 2020. "The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis." *Frontiers in Immunology* 11 (March):511. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00511.

Vincent-Bugnas, Séverine, Sébastien Vitale, Caroline C. Mouline, Wafa Khaali, Yves Charbit, Patrick Mahler, Isabelle Prêcheur, Paul Hofman, Janet L. Maryanski, and Alain Doglio. 2013. "EBV Infection Is Common in Gingival Epithelial Cells of the Periodontium and Worsens during Chronic Periodontitis." *PLoS ONE* 8 (12): e80336. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080336.

Willis, Jesse R., and Toni Gabaldón. 2020. "The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems." *Microorganisms* 8 (2): 308. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020308.

Wirth, Roland, Bernadett Pap, Gergely Maróti, Péter Vályi, Laura Komlósi, Nikolett Barta, Orsolya Strang, János Minárovits, and Kornél L. Kovács. 2021. "Toward Personalized Oral Diagnosis: Distinct Microbiome Clusters in Periodontitis Biofilms." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (December). https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.747814.

World Health Organization. 2022. "Global Oral Health Status Report : Towqards Uinversal Health Coverage for Oral Health by 2030." https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240061484.

Yuan, Shuai, Jialing Wang, Dongjie Zhu, Nan Wang, Qiang Gao, Wenyuan Chen, Hao Tang, et al. 2018. "Cryo-EM Structure of a Herpesvirus Capsid at 3.1 Å." *Science (New York, N.Y.)* 360 (6384). https://doi.org/10.1126/science.aao7283.

Zhang, Chen-Zi, Xing-Qun Cheng, Ji-Yao Li, Ping Zhang, Ping Yi, Xin Xu, and Xue-Dong Zhou. 2016. “Saliva in the Diagnosis of Diseases.” *International Journal of Oral Science* 8 (3): 133–37. https://doi.org/10.1038/ijos.2016.38.

Les annexes

biosensors

MDPI

Article

Centrifugal Microfluidic Cell Culture Platform for Physiologically Relevant Virus Infection Studies: A Case Study with HSV-1 Infection of Periodontal Cells

Juliane Fjelrad Christfort [1,*,†], Morgane Ortis [1], Hau Van Nguyen [2], Robert Marsault [1] and Alain Doglio [1,*]

[1] MICORALIS (E.A. 7354), Faculty of Dental Surgery and Odontology, University Côte d'Azur, 06300 Nice, France; morgane.ortis@univ-cotedazur.fr (M.O.); robert.marsault@univ-cotedazur.fr (R.M.)
[2] IDUN Centre of Excellence, Department of Health Technology, Technical University of Denmark, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark; havng@dtu.dk
* Correspondence: julchr@dtu.dk or juliane.christfort@univ-cotedazur.fr (J.F.C.); alain.doglio@univ-cotedazur.fr (A.D.)
† Present address: Department of Health Technology, Technical University of Denmark, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark.

Abstract: Static well plates remain the gold standard to study viral infections in vitro, but they cannot accurately mimic dynamic viral infections as they occur in the human body. Therefore, we established a dynamic cell culture platform, based on centrifugal microfluidics, to study viral infections in perfusion. To do so, we used human primary periodontal dental ligament (PDL) cells and herpes simplex virus-1 (HSV-1) as a case study. By microscopy, we confirmed that the PDL cells efficiently attached and grew in the chip. Successful dynamic viral infection of perfused PDL cells was monitored using fluorescent imaging and RT-qPCR-based experiments. Remarkably, viral infection in flow resulted in a gradient of HSV-1-infected cells gradually decreasing from the cell culture chamber entrance towards its end. The perfusion of acyclovir in the chip prevented HSV-1 spreading, demonstrating the usefulness of such a platform for monitoring the effects of antiviral drugs. In addition, the innate antiviral response of PDL cells, measured by interferon gene expression, increased significantly over time in conventional static conditions compared to the perfusion model. These results provide evidence suggesting that dynamic viral infections differ from conventional static infections, which highlights the need for more physiologically relevant in vitro models to study viral infections.

Keywords: organ-on-a-chip; centrifugal microfluidics; dynamic viral infection; infection gradient; periodontal tissues; human herpes viruses; acyclovir

check for updates

Citation: Christfort, J.F.; Ortis, M.; Nguyen, H.V.; Marsault, R.; Doglio, A. Centrifugal Microfluidic Cell Culture Platform for Physiologically Relevant Virus Infection Studies: A Case Study with HSV-1 Infection of Periodontal Cells. *Biosensors* **2024**, *14*, 401. https://doi.org/10.3390/bios14080401

Received: 9 July 2024
Revised: 7 August 2024
Accepted: 17 August 2024
Published: 20 August 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

During the past decades, microfluidics has gradually been more applied to create dynamic and physiologically relevant in vitro cell models [1,2]. The term microfluidics refers to the technology of manipulating small fluid volumes through micro-sized channels, chambers, or wells, enclosed or inserted into a microdevice, referred to as a chip [2]. This principle has been employed as a novel method to culture 2D and 3D cell models in perfusion, resulting in more in vivo-like cell cultures compared to the traditional static methods, such as well plates. The microfluidic cell culture technology has been used to study and mimic a variety of different cell types, tissues, and organs, such as the brain, intestine, liver, and kidney, including for organ-on-a-chip purposes [1,3–5]. However, most microfluidic systems require external pumps and tubing to generate and maintain perfusion, which makes them complex and labor-intensive to implement.

More recently, centrifugal microfluidics has been applied as an alternative technology to cultivate cells [6,7]. Here, centrifugal forces are used to manipulate fluids through channels and chambers in a disc-shaped device when it is rotated. Compared to conventional

laminar microfluidic chips, the risk of cell damage due to different forces and an unprecise flow (for example, centrifugal, Coriolis and Euler forces, and Dean flow as a result of the spiral shape [8]) could present a challenge when applying centrifugal microfluidics for cell culturing. However, advantages of centrifugal microfluidic technology include its simplicity and ease of use, since microchannels, chambers, and other microfluidic components are integrated into a compact disc and there is no need for external pumps, valves, or tubing [9]. While this can limit the volumes for fresh culture medium and waste, it is highly advantageous in cell culture, where all components need to be thoroughly sterilized before use.

To study viral infections in vitro, cells cultured in well plates remain the gold standard model. However, static monolayer cell models do not adequately mimic the complex environment of the human body [10,11]. Specifically in virology, more dynamic in vitro platforms are crucial for improved disease modeling. So far, the understanding of infection kinetics, host-virus interactions, and drug resistance has been limited by the inability to reproduce the dynamic complexity of viral infections in vitro [12]. To meet this need, microfluidic platforms have been investigated to recapitulate most life cycle steps of different pathogenic viruses, including a 3D liver culture for human hepatitis B virus [13], a gut-chip prototype for human enterovirus infection [14], and a nervous system-on-a-chip enabling pseudorabies virus infection [15]. Recently, microfluidic chips have been proposed to investigate different strains of influenza or coronaviruses responsible for pandemic outbreaks [16] or epidemic viruses such as Ebola [17].

Despite oral health being a major global health issue [18] and accumulating evidence associating the oral microbiota with several systemic diseases [19–24], only a few oral microfluidic cell culture platforms have been reported [25]. A recent review (2024) includes six original research articles describing microfluidic chips mimicking soft tissues in the oral cavity, including tissue models with one or more cell types [26]. For example, Rahimi et al. [27] developed a 3D tissue model with oral keratinocytes and fibroblasts cultured in collagen in polydimethylsiloxane microchannels. The model was applied to investigate cellular responses to dental materials or oral bacteria and found more sensitive when evaluating cell viability than traditional well-plate cultures [27]. Apart from soft tissues, microfluidic models of the oral cavity also include models mimicking teeth, bones, cancer, and salivary glands [26].

Among oral diseases, periodontitis is a widespread chronic gum disease, advancing in relapses and successive stages over years. It leads to progressive destruction of the tooth supporting tissues [28,29], including the gingiva, the alveolar bone, and the periodontal dental ligament (PDL) (Figure 1A). Traditionally, the pathogenesis of periodontitis has been explained as an infection caused by pathogenic oral bacteria colonizing the tooth surface and the gingival sulcus [30]. However, bacterial-host interaction alone does not adequately explain the clinical characteristics of the disease (e.g., its progressive nature and localized occurrence) [31]. Recently, human herpes viruses have been suggested to play a major role in the progression of periodontitis [20,32,33], and numerous studies have shed light on the potential involvement of human herpes simplex type 1 (HSV-1) in the pathogenesis of periodontitis [34,35]. Recently, insights from our lab provided the first evidence supporting efficient HSV-1 infection of PDL cells [36]. The PDL is a thin connective ligament tissue connecting the tooth root to the dental alveolar bone (Figure 1A), and PDL cells have been shown to synthesize immunomodulatory cytokines influencing the local response to infections [37–40]. Thus, the PDL tissue plays a crucial role in periodontal integrity and homeostasis.

In the present work, we establish a microfluidic cell culture model of primary human PDL cells isolated from tissue surrounding freshly extracted teeth (Figure 1B) to study interactions between human cells and periodontal pathogens, such as HSV-1, involved in periodontal diseases. As a major novelty, the model is based on centrifugal microfluidics, which has only recently been applied for long-term (6 days) mammalian cell culture [41], but never with primary cells or for virus infection studies. Additionally, to increase

the throughput of the system, we propose a 3D-printed stacking unit to run multiple replicates on the same motor (Figure 1C and Figure S1 in Supplementary). Thereby, we aim to accommodate the need for a dynamic model to study viral infections in a more physiologically relevant—and yet simple—manner, allowing for real-time analysis of the inflammatory response of cells upon viral challenge.

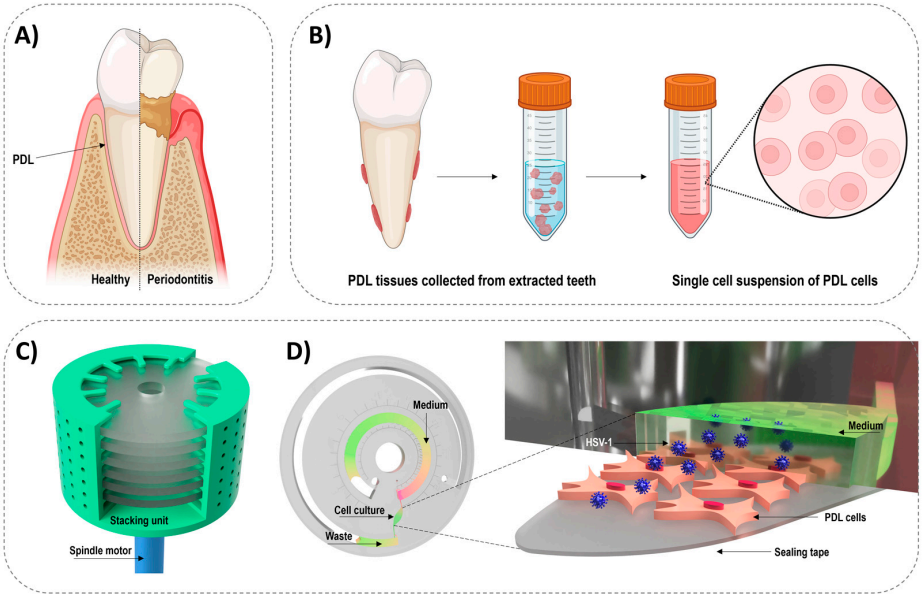


Figure 1. Overview of the study background and setup. (**A**) Illustration of the periodontal environment in health and diseases, showing the location of the PDL between the tooth root and the alveolar bone. (**B**) A simplified schematic overview of the isolation of single PDL cell suspensions from the PDL tissues surrounding extracted teeth. (**C**) Illustration of the stacking unit with multiple chips inside installed on a spindle motor (see Figure S1 in Supplementary for additional illustrations and pictures of the stacking unit). (**D**) Illustration of the microfluidic chip design (**left**), where a zoom shows the location of the cells in the cell culture chamber and the concept of introducing viruses with flow (**right**).

2. Materials and Methods

2.1. Design and Fabrication of the Centrifugal Microfluidic Cell Culture Platform

The platform includes a brushless spindle motor (Maxon, Switzerland) (Figure 1C) and a microfluidic disc-shaped chip for cell culture (Figure 1D) [41]. When spinning the disc, a flow of growth medium is created in the microfluidic channels. The chip comprises a cell chamber (23 µL, 0.30 cm^2) and a medium (3 mL) and waste chamber (5 mL), which are all connected via microchannels (0.15 mm) (Figure 1C). The microchannels between the cell chamber and the medium and waste chambers are placed in the top of the cell chamber to ensure minimal disturbance of the cells during perfusion. Additionally, these microchannels act as passive valves, preventing overflow of cells into the spiral-shaped media chamber when cells are introduced into the chip. The openings (venting holes) of the medium and waste chamber were closed with sterile adhesive filters (HJ-bioanalytik, Erkelenz, Germany).

The microfluidic chip was designed and fabricated as previously described [41]. Briefly, the chip was designed in the computer-aided software SolidWorks 2018 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France) and assembled from four layers of poly(methyl methacrylate) (PMMA) (0.5 and 5 mm) (PSC A/S, Brønderslev, Denmark; Nordisk plast, Randers,

Denmark) bonded together by three layers of double-sided pressure-sensitive adhesive (PSA) (ARcare® 90106, Adhesive Research, Limerick, Ireland). The PMMA layers were fabricated using a laser ablation technique (Epilog Mini 18 30 W system, Epilog, Golden, CO, USA), and the PSA was cut with a Graphtec cutter (CE-40, Graphtec, Irvine, CA, USA) with a bonding press (PW 10 H, P/O/Weber, Remshalden, Germany) with a force of 1 kN for 1 min. The stacking unit was fabricated using a 3D printer (Formlabs, Somerville, MA, USA).

2.2. Preparation of PDL Single Cell Suspensions and Cell Culture

Human primary PDL cells were isolated from PDL tissue surrounding extracted teeth (Figure 1B) and immortalized as previously described [36]. All patients were informed of their right to oppose the use of their specimens and data for research purposes (biomedical collection N° DC-2022-5040, French Ministry of Higher Education, Research and Innovation, Paris, France). Briefly, extracted teeth were immersed in phosphate-buffered saline (PBS) containing antibiotics and antifungals and kept at 4 °C for less than 24 h. After 2 washings in PBS, PDL tissues were collected through scalpel-scraping of the mid-third of the root surface. A single cell suspension of PDL cells was obtained after digestion of PDL tissues with type I collagenase (3 mg/mL) and dispase II (4 mg/mL) for 30–40 min at 37 °C and passed through a cell strainer (70 µm). After centrifugation, the cells were resuspended in alpha minimum essential medium (αMEM) supplemented with 0.292 µg/mL L-Glutamine and 10% fecal calf serum (FCS) [36].

For regular cell culture, the PDL cells were cultured in αMEM containing 10% (*v*/*v*) FCS, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin and maintained in a humidifying incubator (37 °C, 5% CO_2). Between passages, the cells were dissociated with a trypsin/EDTA solution (0.25%/0.02%) and subcultured in complete medium. The cells were evaluated with a bright-field microscope (Nikon TMS, Nikon, Tokyo, Japan) and counted using a Malassez counting chamber (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Germany).

2.3. PDL Cell Seeding and Growth in the Microfluidic Chip

Prior to cell seeding, the fully assembled chip was cleaned and sterilized for 1 h with 0.5 M sodium hydroxide and carefully rinsed with sterile water. The cell culture chamber was coated with 23 µL of Matrigel® Matrix (Corning Inc.®, Corning, NY, USA) at 37 °C for 1 h, after which the remaining Matrigel was removed. The PDL cells were seeded by adding a suspension of cells in αMEM directly to the cell chamber using a syringe needle (7.7×10^4 cells/cm^2). The cell suspension volume was limited to 23 µL, so it did not overflow into the spiral channel. The microfluidic chips were placed in the stacking unit on the motor, which was placed inside an incubator traditionally applied for cell culture (37 °C with 5% CO_2 in a humidified atmosphere). The cells were allowed to adhere in static conditions overnight before the medium chamber was filled with cell culture medium and rotation was initiated (0.7 Hz). The resulting flow rate was determined by measuring the movement of the cell culture medium over a defined period of time. By using volume markers for every 20 and 100 µL along the medium chamber (Figure S2 in Supplementary), the difference in medium level could be determined with sufficient accuracy. After 24 and 48 h, the motor was briefly stopped and the cells were imaged (ZEISS Axio Vert.A1, ZEISS, Oberkochen, Germany).

2.4. HSV-1 Infection of PDL Cells in the Microfluidic Chip

The HSV-1 isolate used in this study was a mCherry red fluorescent protein-tagged HSV-1 strain (HSV-1 mCherry) [42]. HSV-1 viral stock was produced in αMEM medium using PDL cells as amplifying cells. The viral titer of the stock was determined by testing serial viral dilutions to define the 50% tissue culture infectious dose that promoted a cytopathic effect on PDL cells.

When the cells had grown to a confluent monolayer in the disc (3 days after seeding), the motor was briefly stopped, a suspension of HSV-1 mCherry in αMEM was filtered

(0.4 µm) and added to the medium chamber (multiplicity of infection (MOI) of 6), and the rotation was reinitiated to allow the virus to reach the PDL cells via flow. After 1.5 h, the cells were carefully washed with PBS, and fresh αMEM was added. For studies in the presence of the antiviral drug acyclovir, it was added to the medium (40 µg/mL) when introducing HSV-1. At 2, 24, and 48 h post infection, the motor was briefly stopped, and the chip was taken to the microscope (ZEISS Axio Vert.A1, ZEISS, Oberkochen, Germany) for brightfield and fluorescent imaging. Immediately after imaging, the chip was placed back on the motor for continuous spinning.

For comparison to static conditions, the same study was carried out with PDL cells cultured in a 96-well plate. To mimic the conditions in the chip as closely as possible (except for the flow), all protocol steps, procedures, cell seeding, and chemicals were kept constant. 96-well plates were applied as static references since each well has approximately the same surface area as the cell culture chamber in the chip (0.32 cm^2 in the 96-well compared to 0.30 cm^2 in the chip).

2.5. RNA Extraction and RT-qPCR

At 2 h and 48 h post infection, the PDL cells were detached directly in the chip using a lysis buffer (Buffer RLT, Qiagen, Hilden, Germany) and collected with a syringe needle for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis. RNA extraction was performed using a Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified using a microvolume spectrophotometer (SimpliNano™ Biochrom, Cambridge, UK). All samples were normalized to 1.0 ng/µL in the retro-transcriptase step, which was completed independently of the PCR. RT-qPCR experiments were performed using QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™, Waltham, MA, USA) with 2 ng of cDNA (equivalent RNA), using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), in a final volume of 20 µL. The following amplification conditions were applied: 95 °C, 10 min; (95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min) cycled 40 times. The following six target genes were quantified: infected cell protein (ICP) 0, 4, and 8, and the antiviral proteins interferon (IFN) α, β, and λ. Each sample was run in technical triplicates using specific primer sets for each gene (Table 1). Relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, with the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene as the reference gene and corresponding controls (PDL cells without HSV-1 infection (with/without acyclovir)) as reference samples.

Table 1. List of primers.

	Forward Primer (5′ → 3′)	**Reverse Primer (5′ → 3′)**
GAPDH	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT
ICP0	GTCGCCTTACGTGAACAAGAC	GTCGCCATGTTTCCCGTCTG
ICP4	CGACACGGATCCACGACCC	GATCCCCCTCCCGCGCTTCGTCCG
ICP8	CGACAGTAACGCCAGAAG	GGAGACAAAGCCCAAGAC
IFNα	AGAAGGCTCCAGCCATCTCTGT	TGCTGGTAGAGTTCGGTGCAGA
IFNβ	CTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGC	TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA
IFNλ	AACTGGGAAGGGCTGCCACATT	GGAAGACAGGAGAGCTGCAACT

2.6. Data Analysis and Visualization

Visualization and analysis of the data were carried out in GraphPad Prism version 10.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Other graphical illustrations were created using Biorender.com. For averages, the results are shown as mean ± standard deviation.

3. Results and Discussion

3.1. Centrifugal Microfluidic Chip Design

The applied microfluidic chip is based on centrifugal microfluidics, which allows for cell culturing in perfusion without the need for external pumps or tubing. The culture chamber is perfused with a liquid flow going from the medium chamber to the waste

chamber. In general, the microfluidic chambers and channels in the chip were designed and architected to minimize Dean flow in the cell growth chamber, preventing the occurrence of secondary flow and maintaining laminar flow where the cells are grown. The medium chamber, with its spiral shape, risks being exposed to Dean flow. However, in the cell growth chamber, Dean flow is minimized due to the oval shape and orientation following the path of the centrifugal force generated by the spinning motor. This setup allows the solution to be pumped through the cell growth chamber by centrifugal force, resulting mainly in laminar flow.

When characterizing the flow of cell culture medium in the chip, a flow rate of 0.23 ± 0.14 µL/min (n = 14) was achieved when applying a rotational frequency of 0.7 Hz. At this flow rate, no damage to the cells was observed by microscopy. Additionally, comparing static and perfusion cell culture conditions did not reveal any differences in cell morphology and gene expression. For example, the housekeeping gene GAPDH was detected at very comparable levels by RT-qPCR in both conditions. This rotational frequency was applied throughout the present work.

The observed flow rate of 0.23 ± 0.14 µL/min is similar to previously reported values, where a rotational frequency of 0.7 Hz corresponded to a flow rate of 0.25 µL/min [41]. In the same study, a good linear dependency ($r^2 = 0.97$) was observed from 0.7–1.0 Hz. Additionally, the maximum shear stress was simulated to be 0.08 mPa (at 0.6 µL/min) [41]. A shear stress in this range should not result in any adverse effects on the cells during the experiment [43]. In any case, the expected shear stress from a flow rate around 0.25 µL/min, as used in the present work, is estimated to be well below any value stressing or damaging the cells.

3.2. Culturing of Periodontal Ligament Cells in the Microfluidic Chip

Based on the PDL cell model presented by Chevalier and Ortis et al. [36], single-cell suspensions of primary PDL cells were obtained from PDL tissues collected from extracted teeth. Following isolation, PDL cells were seeded in the cell culture chamber of the chip and allowed to attach in static conditions overnight. After attachment, the cells grew and formed an 80–100% confluent monolayer in the cell culture chamber after 48 h perfusion (Figure 2). In total, the PDL cells were successfully cultured in the chip for 5 consecutive days (3 days + 2 days infection study) in perfusion.

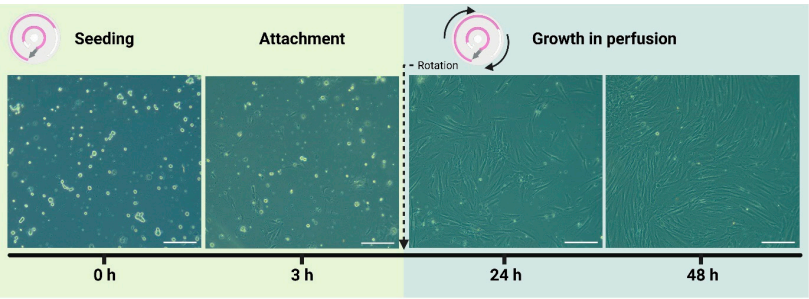


Figure 2. Seeding and growth of PDL cells in the microfluidic chip device. Representative brightfield images (10×) at 0 h (immediately after seeding), at 3 h (after attachment in static conditions), and at 24 h and 48 h (after growth in perfusion). A total of 7.7×10^4 cells/cm^2 were seeded at 0 h. All scale bars represent 200 µm.

The morphology of the growing and confluent primary PDL cell culture was similar to that of fibroblast-like cells, which has also been observed for primary PDL cells cultured in static conditions (Figure S3 in Supplementary and [36]).

Previously, the present chip has been used to successfully culture commercially available adherent cell lines within a similar time frame to that of the present study (Caco-2

and HeLa cells during 24 h and 6 days, respectively) [41], where we, in the present work, further adapt the method to allow culturing of primary cells directly isolated from fresh human tissue.

3.3. HSV-1 Infection of PDL Cells and Treatment with Acyclovir

To investigate how flow affects the establishment and treatment of HSV-1 infections in PDL cells, PDL cells were infected with HSV-1 mCherry (Figure 3). In contrast to traditional virus infection protocols, HSV-1 was added to the medium in the medium chamber and, hereafter, allowed to reach the cells with the perfusing medium.

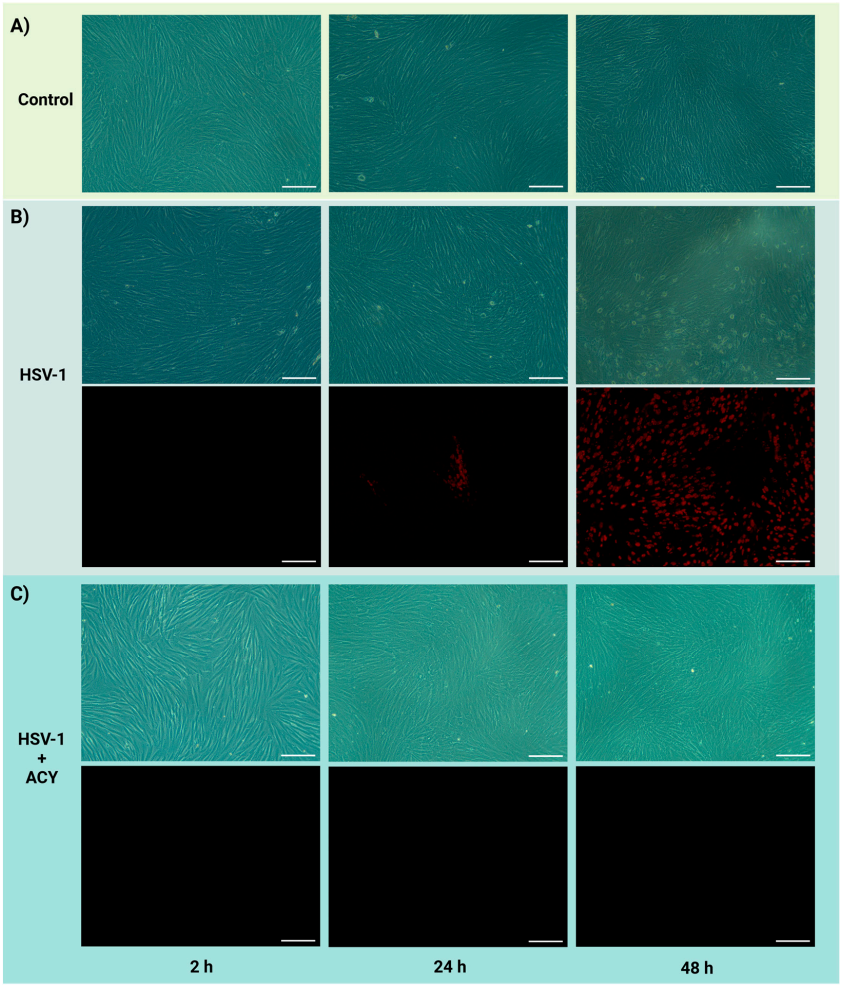


Figure 3. HSV-1 infection of PDL cells in perfusion. Representative corresponding brightfield and fluorescent images (10×) showing (**A**) the growth of PDL cells without HSV-1 infection (control), (**B**) HSV-1 infection of PDL cells (MOI 6), and (**C**) HSV-1 infection of PDL cells (MOI 6) in the presence of acyclovir (40 μg/mL). The cells were imaged at 2, 24, and 48 h after adding HSV-1 to the cell culture medium. All scale bars represent 200 μm.

No visual effect could be seen on the cells 2 h post infection when compared to cells without infection, and no fluorescent signal was observed from HSV-1 mCherry

(Figure 3A,B). After 24 h, the first signs of viral infection were visible by fluorescent imaging, but no remarkable morphological changes, revealing HSV-1 cytopathic effect, could be observed. After 48 h, the infection increased in intensity, and most cells were infected. Profound morphological changes, such as ballooning and detachment of dead cells (Figure 3B), highlighted that the cytolytic activity of HSV-1 in PDL cells was maintained in perfusion (see Figure S4 in Supplementary for enlarged images with highlighted characteristics).

Previously, onset of cytopathic effects in primary PDL cells had been observed already after 24 h in static conditions [36]. This may reflect the possibility that, in static conditions, the accumulation of new viruses in culture supernatant could favor abundant reinfection events and more rapid cytopathic effects when compared to a microfluidic system preventing virus accumulation in the supernatant. Additional studies are needed to further investigate this aspect, but it suggests that the use of a microfluidic chip with perfusion can be more relevant to mimic viral infections in the oral cavity, where viruses are infecting cells via the salivary and sulcular flows or the blood stream [44].

To test the efficacy of an antiviral drug as an inhibitor of viral spreading in perfusion, PDL cells were infected with HSV-1 in the presence of acyclovir (Figure 3C), a well-known antiviral drug used to treat HSV-1 infections. The presence of acyclovir, added along with HSV-1 in the medium chamber, fully inhibited HSV-1 infection of PDL-cells adherent on the microchip throughout the duration of the infection study (48 h) (Figure 3C).

3.4. RT-qPCR Analysis of HSV-1 Gene Expression and Interferon Response in the Microfluidic Chip and Static Conditions

RT-qPCR studies were carried out to provide quantitative information about the viral gene expression and the cellular response to the viral infection (Figure 4). After setting up appropriate methods for RNA collection directly from the cell culture chamber in the chip, we obtained between 10–20 ng/µL RNA from cells in the chip.

HSV-1 infection of PDL-cells in the chip was monitored by analyzing gene expression of the immediate-early (ICP0 and ICP4) and early (ICP8) HSV-1 viral transcripts in the presence and absence of acyclovir. Additionally, expression of the viral transcripts was quantified after a similar experiment carried out in static conditions (96-well plate) to compare dynamic microfluidic-based infection (Figure 4A,B) with infection in static conditions (Figure 4C,D).

In the chip, an increasing level of ICP0, ICP4, and ICP8 was observed during the experiment compared to the control without infection (Figure 4A). Already 2 h post infection, a relative quantification of 1.6×10^3, 5.2×10^2, and 1.2×10^4 was observed for ICP0, ICP4, and ICP8, respectively, and after 48 h, all ICP genes reached higher values (5.3×10^6, 2.8×10^6, and 2.3×10^5, respectively). When comparing the infection to PDL cells cultured in static conditions (Figure 4C), no significant differences were observed, indicating very similar viral gene profiling for the immediate-early and the early HSV-1 viral transcripts in both conditions.

In the presence of acyclovir (Figure 4A), a relative quantification of 7.1×10^1, 1.8×10^1, and 6.6×10^1 was observed for the three ICP genes after 2 h in the chip, which were all lower than the corresponding quantifications without acyclovir. Although not significant, acyclovir appears to have a larger antiviral effect on HSV-1 in the chip (Figure 4A) than in static conditions (Figure 4B) after 2 h, compared to the infection without acyclovir. After 48 h, the presence of acyclovir efficiently inhibited the viral gene expression, which did not increase between 2 h and 48 h and remained much lower compared to infection experiments without acyclovir. Both in static and flow conditions, the presence of acyclovir resulted in remarkedly lower levels of both ICPs after 48 h and was, thus, able to control the HSV-1 infection within the time of the experiment. Acyclovir is known to act by blocking the HSV-1 infection at a late stage of the viral cycle by inhibiting the viral DNA polymerase activity and, thus, only affects viral replication without any effect on viral entry and early viral gene expression [45]. Thereby, it was expected that acyclovir would not have any inhibitory effect on ICP0, ICP4, and ICP8 2 h post-infection.

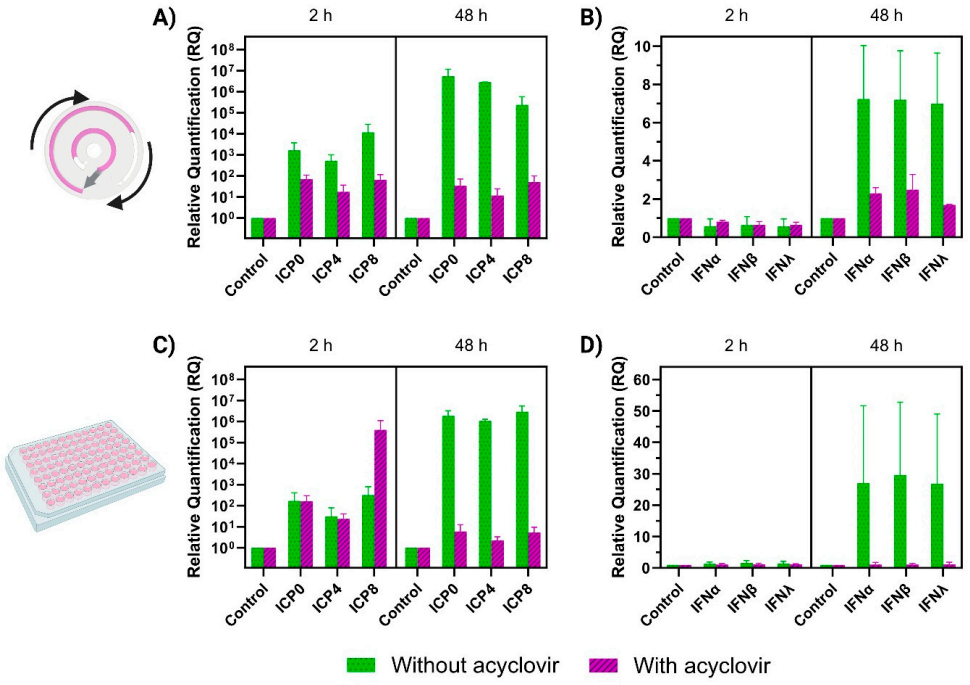


Figure 4. RT-qPCR quantification at 2 and 48 h after HSV-1 infection of PDL cells. Relative quantification of ICP0, ICP4, and ICP8 (**left**) and IFNα, IFNβ, and IFNλ (**right**) after culture in (**A**,**B**) perfusion conditions the chip and (**C**,**D**) static conditions in a 96 well plate. The genes were quantified after HSV-1 infection without acyclovir (green, dotted bars) and with acyclovir (pink, striped bars) (mean ± SD, n = 2–3). All samples were run in technical triplicates, and relative gene expression levels were calculated using the $2-\Delta\Delta CT$ method and normalized according to the GAPDH as a reference gene and corresponding controls (PDL cells without HSV-1 infection (with/without acyclovir) as a reference sample).

Concurrently, we investigated the innate cellular response by monitoring expression of interferon genes, namely the type I IFNs (IFNα and IFNβ) and type III IFN (IFNλ), which are antiviral proteins produced by cells as the body's first line of antiviral defense in response to a viral infection [46]. IFNα, IFNβ, and IFNλ (Figure 4B) were initially (2 h) all present in levels similar to the control group, both with and without acyclovir present. However, at 48 h post infection onset, a relative quantification of 7.2, 7.2, and 7.0 was observed for IFNα, IFNβ, and IFNλ, respectively, without acyclovir, whereas these numbers were significantly lower in the presence of acyclovir (2.3, 2.5, and 1.7, respectively) (Figure 4B).

For the IFNs in static conditions (Figure 4D), similar tendencies were observed. At 2 h, both IFNα, IFNβ, and IFNλ were detected in levels similar to the control (1.3, 1.6, and 1.4, respectively). After 48 h, IFN levels increased as expected based on the studies in perfusion, but to much higher levels (27, 30 and 27, respectively) (Figure 4D). With acyclovir, a level of 1.1 was observed for all three IFNs after 48 h, which was slightly lower than in the microfluidic chip (2.3, 2.5, and 1.7, respectively). A reason for the larger quantification of IFNs in the static setup compared to the chip with perfusion could be related to the continuously perfusing medium resulting in some level of 'clearance' of the already secreted IFNs, which would normally induce the production and secretion of additional IFNs. However, the complex interplay between the IFN pathway and HSV, where the ICP genes

disrupt the IFN response (both by blocking pathways and downregulating the level of expression of IFN-stimulated genes) [46], should also be taken into consideration.

3.5. Infection Gradient

It was of major interest to investigate how the infected cells were distributed within the cell culture chamber during the infection in perfusion (Figure 5). Since the HSV-1 virus was introduced to the cells via medium perfusing from the first part of the cell culture chamber towards the end of the chamber, it could theoretically result in an infection gradient. For fluorescent image analysis, we considered two parts of the cell chamber, namely (i) the first third of the cell chamber (closest to the inlet channel) and (ii) the last third of the cell chamber (closest to the waste chamber) (Figure 5A).

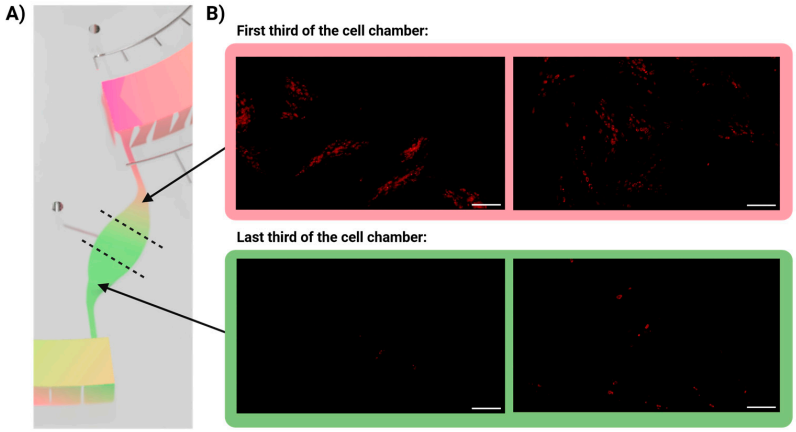


Figure 5. HSV-1 infection gradient occurring gradually from the inlet in the cell chamber towards the outlet from the cell chamber 24 h after infection. (**A**) Schematic overview of the areas defined for imaging. (**B**) Fluorescent images of PDL cells in different parts of the cell culture chamber infected with HSV-1 mCherry (MOI 6) at 24 h post infection. All scale bars represent 200 μm.

As seen from Figure 5, an infection gradient was observed 24 h post infection, shown here as infected cells (fluorescent signal) in the first third of the cell chamber in contrast to no or very few infected cells in the last third of the cell chamber (Figure 5B). The infection gradient phenomenon was observed in the majority of the replicate studies. A gradient of infection in the cell chamber would mean that a first round of infection is occurring in the cells closest to the inlet channel (initially exposed to HSV-1) during the first 24 h, whereafter the cells in the rest of the cell chamber are infected within the next 24 h (Figure 3B). This may be explained by the fact that infections were performed at low MOI (<10), with a short exposure time (90 min), followed by washings. Moreover, the flow rate was rather low (0.24 μL/min), meaning that only approx. 20 μL of the ~3 mL medium in the medium chamber reached the cell culture chamber before washing. In such experimental conditions, it is likely that the few viral particles slowly entering the cell chamber will be trapped by the first rows of cells, leaving the cells most distant from the entrance to the chamber uninfected. Such an infection gradient has not previously been reported, most likely since viral infection studies are traditionally carried out in static conditions, and, thus, all the cells are exposed to the virus at the same time. Of note, the infection experiments were only carried out with a low MOI (<10) to avoid saturating the cells with a high viral load. However, as a future perspective, it would be interesting and relevant to investigate whether the infection gradient varies with the titer of virus loading (i.e., MOI level).

4. Conclusions

In the present work, we have developed a flow-based in vitro infection model, based on a novel microfluidic platform, to study dynamic interactions related to oral diseases, which is otherwise not available today. We demonstrated that it is possible to seed and culture human primary PDL cells under continuously perfusing medium (0.23 ± 0.14 μL/min) and obtain a confluent cell layer. Additionally, we showed that HSV-1 replicates in PDL cells under perfusion and that the model can be used to study the effect of antiviral drugs in perfusion, with acyclovir as a proof-of-concept drug. In general, similar HSV-1 gene expressions were observed when comparing the infection of the PDL cells in the microfluidic chip to cells cultured in static conditions. However, differences in the innate antiviral response could be observed as much higher levels of IFNs in static conditions (27–30), compared to in the chip in perfusion (7.0–7.2), although the higher levels in static conditions also resulted in larger standard deviations.

Finally, we showed that the infection occurs as a gradient in the direction of the flow at 24 h before infecting cells in the entire cell chamber at 48 h. This is especially interesting since an infection gradient enables studies of intercellular communication between infected cells and cells that have not yet been infected. For future work, this would also be interesting to study in shorter time intervals. However, this would require further optimization of sampling techniques and quantification methods.

In conclusion, the developed microfluidic chip with primary human PDL cells revealed interesting differences from static experiments and offers a more physiologically relevant method to study virus infections and drug candidates in vitro. Although centrifugal microfluidics introduces additional forces compared to traditional laminar microfluidic systems, such as centrifugal, Coriolis, and Euler forces, which may result in Dean flow in the channels, our study establishes the usefulness and feasibility of this technology for cell culture, in particular for dynamic viral infections. This can pave the way for real-time evaluation of antiviral drugs, resulting in more relevant determination of the dose-response curves and EC50 values of different compounds against viral infections. Ultimately, more physiologically relevant in vitro models can lead to new proposed treatment strategies—both for periodontitis but also for other diseases caused by dysbiosis in the local microbiome, including viruses.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/bios14080401/s1, Figure S1: 3D printed stacking unit for enabling multiple replicates on one motor. (A) Multi-angle illustrations of the 3D printed stacking unit. (B) The stacking unit with multiple chips inserted. (C) Installation of the stacking unit on a spindle motor. (D) Various through-put models of the stacking unit; Figure S2: An image of a chip showing the volume markers used to calculate the flow rate of the system. The long markers are equal to 100 μL and the short markers are equal to 20 μL; Figure S3: Growth of PDL cells in static conditions (96 well plate). Representative brightfield images (10×) at (A) 0 h (immediately after seeding), at (B) 24 h and at (C) 48 h. A total of 7.7 × 104 cells/cm^2 were seeded at 0 h. All scale bars represent 200 μm; Figure S4: Enlarged version of selected brightfield images (10×) from Figure 3 showing PDL cells in the chip after 4 days of culture (2 days culture followed by 48 h HSV-1 infection) in perfusion. (A) PDL cells without HSV-1 (control) showing a fully confluent cell layer. (B) PDL cells exposed to HSV-1. The HSV-1 infection results in morphological changes such as ballooning and detachment of dead cells (red arrows highlighting examples). Scale bars represent 200 μm.

Author Contributions: Conceptualization, J.F.C. and A.D.; Formal analysis, J.F.C., M.O. and R.M.; Funding acquisition, J.F.C.; Investigation, J.F.C., M.O. and R.M.; Methodology, J.F.C., H.V.N. and R.M.; Project administration, J.F.C. and A.D.; Resources, A.D.; Validation, J.F.C., M.O. and R.M.; Visualization, J.F.C., M.O. and H.V.N.; Writing—original draft, J.F.C. and A.D.; Writing—review and editing, J.F.C., M.O., H.V.N., R.M. and A.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research was conducted at the Faculty of Dental Surgery and Odontology, University Côte d'Azur, and funded by an International Postdoc Fellowship from the Independent Research Fund Denmark, grant number 2031-00008B (to J.F.C.).

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (biomedical collection N° DC-2022-5040, 19 May 2022).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. All subjects were informed of their right to oppose the use of their specimens and data for research purposes.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Material.

Acknowledgments: We thank Lina Gruzinskyte (DTU Health Tech, present: Ramskov Consulting Group) for assistance with chip fabrication, Kinga Zór (DTU Health Tech) for discussions of the general concept of the platform, and Professor Prashant Desai (The Johns Hopkins University School of Medicine) for generously gifting the HSV-1 mCherry virus. Figures and illustrations were created with Biorender.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest, and the funders had no role in the design of the study, in the collection, analysis, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Ingber, D.E. Human Organs-on-Chips for Disease Modelling, Drug Development and Personalized Medicine. *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 467–491. [CrossRef]
2. Chi, C.W.; Ahmed, A.R.; Dereli-Korkut, Z.; Wang, S. Microfluidic Cell Chips for High-Throughput Drug Screening. *Bioanalysis* **2016**, *8*, 921. [CrossRef]
3. Kim, H.J.; Ingber, D.E. Gut-on-a-Chip Microenvironment Induces Human Intestinal Cells to Undergo Villus Differentiation. *Integr. Biol.* **2013**, *5*, 1130–1140. [CrossRef]
4. Thomas, D.P.; Zhang, J.; Nguyen, N.T.; Ta, H.T. Microfluidic Gut-on-a-Chip: Fundamentals and Challenges. *Biosensors* **2023**, *13*, 136. [CrossRef] [PubMed]
5. Shah, P.; Fritz, J.V.; Glaab, E.; Desai, M.S.; Greenhalgh, K.; Frachet, A.; Niegowska, M.; Estes, M.; Jäger, C.; Seguin-Devaux, C.; et al. A Microfluidics-Based in Vitro Model of the Gastrointestinal Human-Microbe Interface. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11535. [CrossRef] [PubMed]
6. Serioli, L.; Laksafoss, T.Z.; Haagensen, J.A.J.; Sternberg, C.; Soerensen, M.P.; Molin, S.; Zór, K.; Boisen, A. Bacterial Cell Cultures in a Lab-on-a-Disc: A Simple and Versatile Tool for Quantification of Antibiotic Treatment Efficacy. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 13871–13879. [CrossRef]
7. Schneider, S.; Erdemann, F.; Schneider, O.; Hutschalik, T.; Loskill, P. Organ-on-a-Disc: A Platform Technology for the Centrifugal Generation and Culture of Microphysiological 3D Cell Constructs Amenable for Automation and Parallelization. *APL Bioeng.* **2020**, *4*, 046101. [CrossRef]
8. Zhao, Q.; Yuan, D.; Zhang, J.; Li, W. A Review of Secondary Flow in Inertial Microfluidics. *Micromachines* **2020**, *11*, 461. [CrossRef]
9. Gorkin, R.; Park, J.; Siegrist, J.; Amasia, M.; Lee, B.S.; Park, J.M.; Kim, J.; Kim, H.; Madou, M.; Cho, Y.K. Centrifugal Microfluidics for Biomedical Applications. *Lab Chip* **2010**, *10*, 1758–1773. [CrossRef]
10. Jensen, C.; Teng, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 513823.
11. Kapałczyńska, M.; Kolenda, T.; Przybyła, W.; Zajączkowska, M.; Teresiak, A.; Filas, V.; Ibbs, M.; Bliźniak, R.; Łuczewski, Ł.; Lamperska, K. 2D and 3D Cell Cultures—A Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures. *Arch. Med. Sci.* **2018**, *14*, 910. [CrossRef]
12. Baddal, B.; Marrazzo, P. Refining Host-Pathogen Interactions: Organ-on-Chip Side of the Coin. *Pathogens* **2021**, *10*, 203. [CrossRef] [PubMed]
13. Ortega-Prieto, A.M.; Skelton, J.K.; Wai, S.N.; Large, E.; Lussignol, M.; Vizcay-Barrena, G.; Hughes, D.; Fleck, R.A.; Thursz, M.; Catanese, M.T.; et al. 3D Microfluidic Liver Cultures as a Physiological Preclinical Tool for Hepatitis B Virus Infection. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–15. [CrossRef]
14. Villenave, R.; Wales, S.Q.; Hamkins-Indik, T.; Papafragkou, E.; Weaver, J.C.; Ferrante, T.C.; Bahinski, A.; Elkins, C.A.; Kulka, M.; Ingber, D.E. Human Gut-On-A-Chip Supports Polarized Infection of Coxsackie B1 Virus In Vitro. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169412. [CrossRef]
15. Johnson, B.N.; Lancaster, K.Z.; Hogue, I.B.; Meng, F.; Kong, Y.L.; Enquist, L.W.; McAlpine, M.C. 3D Printed Nervous System on a Chip. *Lab Chip* **2016**, *16*, 1393–1400. [CrossRef] [PubMed]
16. Si, L.; Bai, H.; Rodas, M.; Cao, W.; Oh, C.Y.; Jiang, A.; Moller, R.; Hoagland, D.; Oishi, K.; Horiuchi, S.; et al. A Human-Airway-on-a-Chip for the Rapid Identification of Candidate Antiviral Therapeutics and Prophylactics. *Nat. Biomed. Eng.* **2021**, *5*, 815–829. [CrossRef] [PubMed]

17. Junaid, A.; Tang, H.; van Reeuwijk, A.; Abouleila, Y.; Wuelfroth, P.; van Duinen, V.; Stam, W.; van Zonneveld, A.J.; Hankemeier, T.; Mashaghi, A. Ebola Hemorrhagic Shock Syndrome-on-a-Chip. *iScience* **2020**, *23*, 100765. [CrossRef]
18. Jain, N.; Dutt, U.; Radenkov, I.; Jain, S. WHO's Global Oral Health Status Report 2022: Actions, Discussion and Implementation. *Oral Dis.* **2024**, *30*, 73–79. [CrossRef] [PubMed]
19. Hajishengallis, G.; Chavakis, T. Local and Systemic Mechanisms Linking Periodontal Disease and Inflammatory Comorbidities. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 426–440. [CrossRef] [PubMed]
20. Baker, J.L.; Mark Welch, J.L.; Kauffman, K.M.; McLean, J.S.; He, X. The Oral Microbiome: Diversity, Biogeography and Human Health. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *22*, 89–104. [CrossRef] [PubMed]
21. Miles, B.; Zakhary, I.; El-Awady, A.; Scisci, E.; Carrion, J.; O'Neill, J.C.; Rawlings, A.; Kobi Stern, J.; Susin, C.; Cutler, C.W. Secondary Lymphoid Organ Homing Phenotype of Human Myeloid Dendritic Cells Disrupted by an Intracellular Oral Pathogen. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 101–111. [CrossRef] [PubMed]
22. Dioguardi, M.; Crincoli, V.; Laino, L.; Alovisi, M.; Sovereto, D.; Mastrangelo, F.; Lo Russo, L.; Lo Muzio, L. The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 495. [CrossRef]
23. Atarashi, K.; Suda, W.; Luo, C.; Kawaguchi, T.; Motoo, I.; Narushima, S.; Kiguchi, Y.; Yasuma, K.; Watanabe, E.; Tanoue, T.; et al. Ectopic Colonization of Oral Bacteria in the Intestine Drives TH1 Cell Induction and Inflammation. *Science* **2017**, *358*, 359–365. [CrossRef]
24. Kitamoto, S.; Nagao-Kitamoto, H.; Jiao, Y.; Gillilland, M.G.; Hayashi, A.; Imai, J.; Sugihara, K.; Miyoshi, M.; Brazil, J.C.; Kuffa, P.; et al. The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. *Cell* **2020**, *182*, 447–462.e14. [CrossRef]
25. Huang, C.; Sanaei, F.; Verdurmen, W.P.R.; Yang, F.; Ji, W.; Walboomers, X.F. The Application of Organs-on-a-Chip in Dental, Oral, and Craniofacial Research. *J. Dent. Res.* **2023**, *102*, 364–375. [CrossRef] [PubMed]
26. Pierfelice, T.V.; D'Amico, E.; Petrini, M.; Romano, M.; D'Arcangelo, C.; Sbordone, L.; Barone, A.; Plebani, R.; Iezzi, G. A Systematic Review on Organ-on-a-Chip in PDMS or Hydrogel in Dentistry: An Update of the Literature. *Gels* **2024**, *10*, 102. [CrossRef]
27. Rahimi, C.; Rahimi, B.; Padova, D.; Rooholghodos, S.A.; Bienek, D.R.; Luo, X.; Kaufman, G.; Raub, C.B. Oral Mucosa-on-a-Chip to Assess Layer-Specific Responses to Bacteria and Dental Materials. *Biomicrofluidics* **2018**, *12*, 054106. [CrossRef]
28. Kinane, D.F.; Stathopoulou, P.G.; Papapanou, P.N. Periodontal Diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17038. [CrossRef] [PubMed]
29. World Health Organization (WHO). *Global Oral Health Status Report: Towards Universal Health Coverage for Oral Health by 2030*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022.
30. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C.; Kent, R.L. Microbial Complexes in Subgingival Plaque. *J. Clin. Periodontol.* **1998**, *25*, 134–144. [CrossRef] [PubMed]
31. Slots, J. Human Viruses in Periodontitis. *Periodontol 2000* **2010**, *53*, 89–110. [CrossRef]
32. Slots, J.; Slots, H. Periodontal Herpesvirus Morbidity and Treatment. *Periodontol 2000* **2019**, *79*, 210–220. [CrossRef] [PubMed]
33. Diaz, P.I. Subgingival Fungi, Archaea, and Viruses under the Omics Loupe. *Periodontol 2000* **2021**, *85*, 82–89. [CrossRef] [PubMed]
34. Arduino, P.G.; Cabras, M.; Lodi, G.; Petti, S. Herpes Simplex Virus Type 1 in Subgingival Plaque and Periodontal Diseases. Meta-Analysis of Observational Studies. *J. Periodontal. Res.* **2022**, *57*, 256–268. [CrossRef]
35. Song, Y.; Liu, N.; Gao, L.; Yang, D.; Liu, J.; Xie, L.; Dan, H.; Chen, Q. Association between Human Herpes Simplex Virus and Periodontitis: Results from the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2009–2014. *BMC Oral Health* **2023**, *23*, 675.
36. Ortis, M.; Chevalier, M.; Olivieri, C.-V.; Vitale, S.; Paul, A.; Tonoyan, L.; Doglio, A.; Marsault, R. Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Human Periodontal Ligament. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8466. [CrossRef] [PubMed]
37. Park, O.J.; Kim, A.R.; So, Y.J.; Im, J.; Ji, H.J.; Ahn, K.B.; Seo, H.S.; Yun, C.H.; Han, S.H. Induction of Apoptotic Cell Death by Oral Streptococci in Human Periodontal Ligament Cells. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 738047.
38. Nilsson, B.O. Mechanisms Involved in Regulation of Periodontal Ligament Cell Production of Pro-Inflammatory Cytokines: Implications in Periodontitis. *J. Periodontal. Res.* **2021**, *56*, 249–255. [CrossRef]
39. Zhang, Z.; Deng, M.; Hao, M.; Tang, J. Periodontal Ligament Stem Cells in the Periodontitis Niche: Inseparable Interactions and Mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* **2021**, *110*, 565–576. [CrossRef] [PubMed]
40. Chaikeawkaew, D.; Everts, V.; Pavasant, P. TLR3 Activation Modulates Immunomodulatory Properties of Human Periodontal Ligament Cells. *J. Periodontol.* **2020**, *91*, 1225–1236. [CrossRef]
41. Serioli, L.; Gruzinskyte, L.; Zappalà, G.; Te Hwu, E.; Laksafoss, T.Z.; Jensen, P.L.; Demarchi, D.; Müllertz, A.; Boisen, A.; Zór, K. Moving Perfusion Culture and Live-Cell Imaging from Lab to Disc: Proof of Concept Toxicity Assay with AI-Based Image Analysis. *Lab Chip* **2023**, *23*, 1603–1612. [CrossRef]
42. Etienne, L.; Joshi, P.; Dingle, L.; Huang, E.; Grzesik, P.; Desai, P.J. Visualization of Herpes Simplex Virus Type 1 Virions Using Fluorescent Colors. *J. Virol. Methods* **2017**, *241*, 46–51. [CrossRef] [PubMed]
43. Kim, H.J.; Huh, D.; Hamilton, G.; Ingber, D.E. Human Gut-on-a-Chip Inhabited by Microbial Flora That Experiences Intestinal Peristalsis-like Motions and Flow. *Lab Chip* **2012**, *12*, 2165–2174. [CrossRef] [PubMed]
44. Thakkar, P.; Banks, J.M.; Rahat, R.; Brandini, D.A.; Naqvi, A.R. Viruses of the Oral Cavity: Prevalence, Pathobiology and Association with Oral Diseases. *Rev. Med. Virol.* **2022**, *32*, e2311. [PubMed]

45. Kausar, S.; Said Khan, F.; Ishaq Mujeeb Ur Rehman, M.; Akram, M.; Riaz, M.; Rasool, G.; Hamid Khan, A.; Saleem, I.; Shamim, S.; Malik, A. A Review: Mechanism of Action of Antiviral Drugs. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2021**, *35*, 20587384211002621. [CrossRef]
46. Katze, M.G.; He, Y.; Gale, M. Viruses and Interferon: A Fight for Supremacy. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 675–687. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Étude de l'impact du sport sur le microbiote oral

UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR — MICORALIS Microbiologie orale, immunothérapie et santé — LAMHESS Laboratoire Motricité Humaine Expertise Sport Santé

Les données collectées resteront confidentielles.

Critères d'inclusion dans l'étude :

- ☐ Pratiquer une activité sportive d'endurance *(course à pied / cyclisme)* en activité principale
- ☐ Ne pas pratiquer plus 3h de natation par semaine
- ☐ Avoir entre 18 et 30 ans
- ☐ Ne pas avoir pris d'anti-inflammatoires, moins de 48 heures avant l'étude
- ☐ Ne pas avoir pris d'antibiotiques et/ou de probiotiques, moins de 3 semaines avant l'étude

Date de naissance : ___/___/____

Date : ___/___/____

Sexe : ☐ Femme ☐ Homme

Age : _____

Poids : _____

Taille : _____

Cadre réservé à l'investigateur

Nom prénom du sujet : _____

Identifiant du sujet : #_____

Nom et signature de l'INVESTIGATEUR :

_____

Récapitulatif des prélèvements :

N° prélèvements	Date	Heure	Salivaire (S) ou Jonction Dent-Gencive (J)	Au repos ou après un effort		Durée de l'effort	Sport	Échelle d'intensité*
A				☐ Repos	☐ Effort			
B				☐ Repos	☐ Effort			
C				☐ Repos	☐ Effort			
D				☐ Repos	☐ Effort			
E				☐ Repos	☐ Effort			

*Échelle d'intensité ressentie

1 à 4 → Faible intensité

5 à 7 → Moyenne intensité

8 à 10 → Forte intensité

Étude de l'impact du sport sur le microbiote oral

I. Questionnaire IPAQ (International Physical Activity Questionnaire)

Nous nous intéressons aux différents types d'activités physiques que vous faites dans votre vie quotidienne. Les questions qui vous seront posées portent sur le temps que vous avez passé à être actif physiquement au cours des **7 derniers jours**. Merci de répondre à chacune de ces questions même si vous ne vous considérez pas comme une personne active. Les questions concernent les activités physiques que vous faites au travail, dans votre maison ou votre jardin, pour vos déplacements, et pendant votre temps libre.

Pensez aux activités **intenses** et **modérées** que vous avez fait au cours des **7 derniers jours**. Les **activités intenses** font références aux activités qui demandent un effort physique intense et qui vous font respirer beaucoup plus fort que d'habitude. Les **activités modérées** font références aux activités qui demandent un effort physique modéré et qui vous font respirer un peu plus fort que d'habitude.

Partie 1 : Activité physique liée au travail

La première section est à propos de votre travail. Cela inclus les emplois payés, le travail agricole, bénévole, les études, les stages et tout autre type de travail non payé que vous avez effectué en dehors de votre domicile. Ne tenez pas compte du travail non payé que vous effectuez à domicile, comme faire le ménage, jardinage, entretenir la maison ou vous occupez de votre famille. Ces questions seront posées dans la Partie 3.

1) Avez-vous actuellement un emploi ou faites-vous un travail non payé en dehors de votre domicile ?

☐ Oui

☐ Non → ***Passez directement à la Partie 2***

Les questions suivantes portent sur toutes les activités physiques que vous avez faites au cours des **7 derniers jours** au travail qu'il soit payé ou non. Cela ne comprend pas les trajets entre votre domicile et votre travail.

2) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous fait des activités physiques **intenses** comme porter des charges lourdes, creuser, faire de la maçonnerie ou monter des escaliers **au travail** ? *Pensez seulement aux activités physiques qui ont duré au moins 10 minutes d'affilée.*

_____ jours par semaine

☐ Je n'ai pas eu d'activité physique intense *(travail)* → ***Passez à la question 4***

3) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à faire des activités **intenses au travail** au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

4) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous fait des activités physiques **modérées** comme porter des charges légères **au travail** ? *Pensez seulement aux activités physiques qui ont duré au moins 10 minutes d'affilée. N'incluez pas la marche.*

_____ jours par semaine

☐ Je n'ai pas eu d'activité physique modérée *(travail)* → ***Passez à la question 6***

5) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à faire des activités **modérées au travail** au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

6) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous **marché** au moins 10 minutes d'affilée **au travail** ? *N'incluez pas la marche entre votre domicile et votre lieu de travail.*

_____ jours par semaine

☐ Je n'ai pas marché au travail → ***Passez directement à la Partie 2***

7) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à **marcher au travail** au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

Partie 2 : Activité physique liée aux déplacements

Ces questions sont en rapport avec la façon dont vous vous êtes déplacé d'un endroit à un autre, notamment pour vous rendre au travail, dans les magasins, au cinéma, etc.

8) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours vous êtes-vous déplacé **en véhicule motorisé** comme le train, le bus, la voiture ou le tramway ?

_____ jours par semaine

☐ Je ne me suis pas déplacé en véhicule motorisé → ***Passez à la question 10***

9) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à vous déplacer dans un **véhicule motorisé** au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

Maintenant, pensez à vos déplacements à **vélo** et en **marchant** entre votre domicile et votre travail, pour faire des courses ou pour aller d'un endroit à un autre.

10) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous fait du **vélo pour aller d'un endroit à un autre** ? *Pensez seulement aux activités physiques qui ont duré au moins 10 minutes d'affilée.*

_____ jours par semaine

☐ Je ne me suis pas déplacé en vélo → ***Passez à la question 12***

11) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à vous déplacer à **vélo** d'un endroit à un autre au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

12) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous **marché pour aller d'un endroit à un autre** ? *Pensez seulement aux activités physiques qui ont duré au moins 10 minutes d'affilée.*

_____ jours par semaine

☐ Je ne me suis pas déplacé en marchant → ***Passez directement à la Partie 3***

13) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à vous déplacer en **marchant** d'un endroit à un autre au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

Partie 3 : Ménage, entretien de la maison et temps passé à s'occuper de sa famille

Pensez aux activités physiques que vous avez faites au cours de ces **7 derniers jours** à l'intérieur et à l'extérieur de votre domicile comme faire le ménage, le jardinage, faire des travaux d'entretien et vous occuper de votre famille.

14) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous fait des activités physiques **intenses** comme porter des charges lourdes, couper du bois, pelleter de la neige ou creuser **dans votre jardin** ou votre cour ? *Pensez seulement aux activités physiques qui ont duré au moins 10 minutes d'affilée.*

_____ jours par semaine

☐ Je n'ai pas fait d'activité physique intense *(jardin)* → ***Passez à la question 16***

15) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à faire des activités physiques **intenses** dans votre jardin au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

16) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous fait des activités physiques **modérées** comme porter des charges légères, balayer, laver les vitres ou ratisser **dans votre jardin** ou votre cour ? *Pensez seulement aux activités physiques qui ont duré au moins 10 minutes d'affilée.*

_____ jours par semaine

☐ Je n'ai pas fait d'activité physique modérée *(jardin)* → ***Passez à la question 18***

17) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à faire des activités physiques **modérées** dans votre jardin au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

18) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous fait des activités physiques **modérées** comme porter des charges légères, laver les vitres, balayer ou passer la serpillère **à l'intérieur de votre domicile** ? *Pensez seulement aux activités physiques qui ont duré au moins 10 minutes d'affilée.*

_____ jours par semaine

☐ Je n'ai pas fait d'activité physique modérée *(maison)* → ***Passez directement à la Partie 4***

19) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à faire des activités physiques **modérées** à l'intérieur de votre domicile au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

Partie 4 : Activité physique liée aux loisirs, au sport et au temps libre

Pensez à toutes les activités physiques que vous avez faites au cours de ces **7 derniers jours** seulement dans le cadre de votre temps libre, de vos activités sportives ou de vos loisirs. *Ne tenez pas compte des activités que vous avez déjà mentionnées.*

20) Sans compter la marche que vous avez déjà mentionné, au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous **marché** pendant au moins 10 minutes d'affilée pendant votre **temps libre** ?

_____ jours par semaine

☐ Je n'ai pas marché pendant mon temps libre → ***Passez à la question 22***

21) En moyenne, combien de temps avez-vous **marché** au cours de ces 7 derniers jours ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

22) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous fait des activités physiques **intenses** comme de la course à pied, de la nage rapide ou du cyclisme rapide **pendant votre temps libre** ? *Pensez seulement aux activités physiques qui ont duré au moins 10 minutes d'affilée.*

_____ jours par semaine

☐ Je n'ai pas fait d'activité physique intense *(temps libre)* → ***Passez à la question 24***

23) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à faire des activités physiques **intenses** pendant votre temps libre au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

24) Au cours des **7 derniers jours**, combien de jours avez-vous fait des activités physiques **modérées** comme faire du cyclisme et/ou de la natation à allure régulière ou du tennis **pendant votre temps libre** ? *Pensez seulement aux activités physiques qui ont duré au moins 10 minutes d'affilée.*

_____ jours par semaine

☐ Je n'ai pas fait d'activité physique modérée *(temps libre)* ⟶ ***Passez directement à la Partie 5***

25) En moyenne, combien de temps avez-vous passé à faire des activités physiques **modérées** pendant votre temps libre au cours des **7 derniers jours** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

Partie 5 : Temps passé assis

La dernière question porte sur le temps que vous avez passé assis ces 7 derniers jours. Incluez le temps passé au travail, à la maison, le temps passé à étudier ou en stage et durant vos temps de loisirs. Cela doit comprendre le temps passé assis à votre bureau, assis lors d'une visite chez des amis, le temps passé à lire ou bien le temps passé assis ou allongé à regarder la télé. *N'incluez pas le temps passé assis dans un véhicule motorisé que vous avez déjà mentionné.*

26) Au cours des **7 derniers jours**, combien de temps avez-vous passé **assis pendant un jour de semaine** ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

27) En moyenne, le **week-end dernier**, combien de temps avez-vous passé **assis** au cours d'une journée ?

_____heures(s) par jour, _____minutes par jour

Cadre réservé à l'investigateur

Score continu : _____ MET-minutes / semaine

Score catégoriel : ☐ Faible ☐ Modéré ☐ Elevé

II. Sports

1. **Énumérez par ordre de priorité tous les sports que vous pratiquez** *(le numéro 1 étant le plus important)* **et spécifiez :**

Exemple :

SPORTS	Total d'heures par semaine	Nombre de sessions par semaine	Total d'heures d'exercices **intenses**	Total d'heures d'exercices **modérés**
1. Cyclisme	2h	1	2h	-
2. Course à pied	1h30	2	30 min	1h
3. Musculation	3h	3	45 min	2h15

A vous :

SPORTS	Total d'heures par semaine	Nombre de sessions par semaine	Total d'heures d'exercices **intenses**	Total d'heures d'exercices **modérés**
1._____				
2._____				
3._____				
4._____				
5._____				
6._____				

2. **Depuis combien de temps pratiquez-vous à cette fréquence ?** _____

3. **Faites-vous des compétitions ?** ☐ Oui ☐ Non

   Si oui, dans quelle(s) discipline(s) ? _____

   Si oui, à quel niveau *(départemental, régional, national…)* ? _____

4. **Êtes-vous un athlète professionnel ?** ☐ Oui ☐ Non

Cadre réservé à l'investigateur

☐ Groupe 1 ☐ Groupe 2 ☐ Groupe 3

III. Santé

1. Fumez-vous ? :

Cigarette : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, combien de cigarettes par jours ? _____

depuis combien de temps ? _____

Vapotage : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, ☐ avec ou ☐ sans nicotine

combien de fois par jours ? _____

depuis combien de temps ? _____

Autres substances (ex : drogues, cannabis…) ☐ Oui ☐ Non

Si oui, quel type de substances ? _____

A quelle fréquence ? _____

depuis combien de temps ? _____

2. Avez-vous des pathologies connues ? *(Diabète, maladies cardio-vasculaires, allergies…)*

☐ Oui ☐ Non Si oui, lesquelles ? _____

3. Durant les deux dernières années, avez-vous eu une/des altération(s) de votre état de santé ? *(COVID19, grippe…)*

☐ Oui ☐ Non Si oui, quelles pathologies ? _____

4. Souffrez-vous fréquemment d'infections respiratoires des voies aériennes *(pharyngite, bronchite, angine, rhume…)* **?**

☐ Oui ☐ Non Si oui, lesquels ? _____

Environ combien de fois par an ? _____

Si oui, ces infections sont-elles plus fréquentes en période d'entraînement intensif ?

☐ Oui ☐ Non ☐ Pas d'entrainements intensifs

5. Êtes-vous asthmatique ? ☐ Oui ☐ Non

Avez-vous été diagnostiqué(e) par un médecin ? ☐ Oui ☐ Non

Prenez-vous de : Ventoline ? ☐ Oui ☐ Non

Broncho-dilatateurs ? ☐ Oui ☐ Non

Corticostéroïdes ? ☐ Oui ☐ Non

Combiné ? ☐ Oui ☐ Non

Autres : _____

Depuis combien de temps ? _____

Quand prenez-vous votre traitement ? _____ (fréquence)

☐ Avant un effort ☐ Après un effort ☐ Pas en lien avec un effort

6. Êtes-vous sous traitement anti-inflammatoires oraux ?

☐ Oui ☐ Non Si oui, depuis combien de temps ? _____

Pourquoi ? _____

7. Prenez-vous régulièrement d'autres médicaments ? ☐ Oui ☐ Non

Si oui, lesquels ? Pour quels problèmes de santé ?

_____ _____

8. Avez-vous pris des antibiotiques récemment ?

☐ Oui ☐ Non Si oui, il y a combien de temps ? _____

Pendant combien de temps ? _____

9. Avez-vous pris des probiotiques récemment ?

☐ Oui ☐ Non Si oui, il y a combien de temps ? _____

Pendant combien de temps ? _____

10. Pouvez-vous évaluer votre stress en ce moment ? *(Échelle de Likert)*

☐ Aucun stress ☐ Stress modéré ☐ Stress maximum

☐ Léger stress ☐ Stress fort

Si vous faites des compétitions :

Dans quelle mesure vous sentez-vous actuellement stressé(e), en compétition ? *(Échelle de Likert)*

☐ 0 = Pas du tout ☐ 2 = Moyennement ☐ 4 = Extrêmement

☐ 1 = Faiblement ☐ 3 = Fortement

Comment ce stress influence-t-il votre performance ? *(Échelle de Likert)*

☐ -3 = Très négativement ☐ 0 = Pas d'influence ☐ +3 = Très positivement

☐ -2 = Négativement ☐ +1 = Légèrement positivement

☐ -1 = Légèrement négativement ☐ +2 = Positivement

11. Pensez-vous avoir déjà eu une infection à l'un de ces herpès virus ?

Virus	Explications	Oui	Non	Je ne sais pas
HSV1	Herpès labial *(bouton de fièvre)*			
HSV2	Herpès génital			
EBV	Epstein-Barr *(mononucléose / Lymphome de Burkitt)*			
CMV	Cytomégalovirus			
VZV	Varicelle / Zona			
HHV6	Roséole			
HHV7	Roséole			
HHV8	Sarcome de Kaposi			

IV. Alimentation

1. Avez-vous une pratique alimentaire spécifique ?

☐ Aucune ☐ Sans gluten ☐ Autres : _____

☐ Végétarien ☐ Sans lactose

☐ Vegan ☐ Flexitarien

Remarques : _____

2. Quel type de régime pensez-vous pratiquer au quotidien ? *Cochez-le ou les régimes vous correspondants et attribuez un pourcentage selon la fréquence de cette pratique (le total doit faire 100%)*

Régimes	Cocher	Fréquence (en %)
Méditerranéen *Régime où les sucres et les produits industriels sont restreints : Huile d'olive, poissons, produits frais non transformés, fruits / légumes, céréales complètes…)*		
Western diet *Régime riche en glucides et lipides : produits transformés, cuisine rapide, fast-food, sodas…*		
Cétogène *Régime très restrictif riche en lipide et pauvre en glucide : environ 90% lipides, 8% protéines, 2% glucides*		
Hyper-protéiné		
Hyper-glucidique		
Hypocalorique		
Autres : _____		

3. Avez-vous un régime différent à l'approche des compétitions ?

☐ Oui ☐ Non Si oui, de quel type ? _____

4. **Buvez-vous des boissons sucrées** *(sodas, sirop…)* **?**

☐ Oui ☐ Non Si oui, à quelle fréquence ? _____

Depuis combien de temps ? _____

5. **Durant l'effort physique, prenez-vous habituellement :**

- des boissons d'effort *(avec des électrolytes)* :

☐ Oui ☐ Non Si oui, à quelle fréquence ? _____

Depuis combien de temps ? _____

Marque : _____

- des boissons énergisantes *(ex : RedBull)* :

☐ Oui ☐ Non Si oui, à quelle fréquence ? _____

Depuis combien de temps ? _____

Marque : _____

- des gels :

☐ Oui ☐ Non Si oui, à quelle fréquence ? _____

Depuis combien de temps ? _____

Marque : _____

- des barres :

☐ Oui ☐ Non Si oui, à quelle fréquence : _____

Depuis combien de temps : _____

Marque : _____

V. Santé bucco-dentaire

1. Pouvez-vous quantifier la fréquence de vos problèmes bucco-dentaires ? *(caries, aphtes, infections…)*

☐ Jamais ☐ Souvent

☐ De temps en temps ☐ Tout le temps

Si oui, quels types de problèmes : _____

2. Combien de fois par an voyez-vous un dentiste ?

_____ fois par an De façon : ☐ Préventive ☐ Curative

Si vous ne voyez pas un dentiste régulièrement, pourquoi ? _____

3. Quand avez-vous vu un dentiste pour la dernière fois ? _____

4. Avez-vous un appareil dentaire ?

☐ Oui ☐ Non Si oui, de quel type ? _____

5. Avez-vous déjà eu un choc ou un traumatisme au niveau de la bouche *(chocs, coups, fractures, dents cassées…)* **?**

☐ Oui ☐ Non Si oui, de quel type ? _____

6. Portez-vous un protège dent ?

☐ Oui ☐ Non Si oui, pourquoi ? _____

A quelle fréquence ? _____

Est-il : ☐ Standard (sans ajustement) ☐ Semi-adaptable (ajusté dans de l'eau chaude)

☐ Sur mesure (fait chez le dentiste)

7. Pensez-vous souffrir de bruxisme ?

Grincement des dents : ☐ Oui ☐ Non

Serrement des dents : ☐ Oui ☐ Non

8. Utilisez-vous régulièrement des bains de bouche ?

☐ Oui ☐ Non Si oui, à quelle fréquence ? _____

Marque : _____

9. Avez-vous fait un bain de bouche durant la semaine passée ?

☐ Oui ☐ Non

10. A quelle fréquence vous brossez-vous les dents ? _____

11. Quel type de brosse à dent utilisez-vous ?

☐ Électrique ☐ Manuelle ☐ Les deux, en alternance

Quelle est la dureté de votre brosse à dent ? ☐ Souple ☐ Medium ☐ Dure

12. Utilisez-vous des dispositifs complémentaires au brossage ?

☐ Fil dentaire ☐ Brossettes interdentaires ☐ Jet dentaire ☐ Aucun

13. Vous brossez-vous les dents après vos entrainements sportifs ?

☐ Oui ☐ Non

14. Avez-vous les gencives qui saignent lors de vos brossages ?

☐ Oui ☐ Non

15. Généralement, utilisez-vous du dentifrice avec du fluor ?

☐ Oui ☐ Non Marque : _____

VI. Qualité de vie liée à la santé bucco-dentaire : Questionnaire OHIP-14

1) **Avez-vous eu des difficultés à prononcer certains mots à cause d'un problème lié à vos dents, votre bouche ou vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

2) **Avez-vous remarqué que votre sens du goût avait diminué à cause d'un problème lié à vos dents, votre bouche ou vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

3) **Avez-vous eu des douleurs au niveau de la bouche ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

4) **Avez-vous éprouvé de la difficulté à consommer certains types d'aliments à cause de problèmes dus à votre dentition, à l'état de votre bouche ou à vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

5) **Vous êtes-vous senti(e) mal à l'aise, gêné, à cause de problèmes dus à votre dentition, à l'état de votre bouche ou à vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

6) **Vous êtes-vous senti(e) tendu** *(nerveux)* **à cause de problème avec vos dents, votre bouche ou vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

7) **Votre alimentation vous a-t-elle semblé insatisfaisante à cause de problèmes dus à votre dentition, à l'état de votre bouche ou à vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

8) **Avez-vous du interrompre un repas à cause de problèmes dus à votre dentition, à l'état de votre bouche ou à vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

9) **Avez-vous eu des difficultés à vous détendre à cause d'un problème avec vos dents, votre bouche ou vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

10) **Avez-vous été un peu embarrassé/ennuyé à cause d'un problème lié à vos dents, votre bouche ou vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

11) **Avez-vous été irritable au milieu d'un groupe à cause de problèmes dus à votre dentition, à l'états de votre bouche ou à vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

12) **Avez-vous eu des difficultés à faire votre travail habituel** *(difficulté lors d'un entrainement, une compétition)* **à cause d'un problème lié à vos dents, bouche ou prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

13) **Avez-vous pensé que la vie était généralement moins satisfaisante à cause de problèmes dus à votre dentition, à l'état de votre bouche ou à vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

14) **Avez-vous eu une incapacité fonctionnelle totale** *(impossibilité de participer à un entrainement ou à une compétition) à* **cause d'un problème lié à vos dents, votre bouche ou vos prothèses ?**

☐ Jamais ☐ Occasionnellement
☐ Presque jamais ☐ Assez souvent ☐ Très souvent

VII. Bilan dentaire

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Caries	
Obturations	
TWI	
Indice de plaque	
Inflammation Gingivale	
Mobilités Récessions	
Autre (Péricoronarite, PUFA…)	

«Etude pilote Sport et santé : Impact de l'activité physique sur l'homéostasie microbiologique de la cavité orale »

22-PP-11– 2022-A01682-41

Promoteur de l'étude : CHU de Nice - Département de la Recherche Clinique - 4, avenue Reine Victoria - BP 1179 - 06003 Nice Cedex1 – Tel : 04 92 03 40 11 - Fax: 04 92 03 40 75

Investigateur coordonnateur : Dr Margaux Dubois - Service Odontologie / Laboratoire MICORALIS – 5 rue du 22ème BCA, Campus St Jean d'Angély - 06000 Nice - Tel : 04.89.15.22.67

Expression de la non-opposition des patients pour l'utilisation des données à des fins de recherche

Madame, Monsieur,

Il vous est proposé de participer à une étude intitulée : « Etude pilote Sport et santé : Impact de l'activité physique sur l'homéostasie microbiologique de la cavité orale » (ORAMICAP).

Avant de prendre votre décision, il est important que vous compreniez pourquoi cette étude est réalisée et ce qu'elle implique. Ce document est une lettre d'information, qui a pour but de vous fournir toutes les informations nécessaires qui vous permettront de comprendre le but de cette étude, ainsi que ses intérêts et ses contraintes. Prenez le temps nécessaire pour la lire, et discutez-en avec vos proches si vous le souhaitez. N'hésitez pas à poser toutes vos questions au médecin qui vous suit dans le cadre de cette étude si vous souhaitez plus d'informations.

Un refus de votre part ne modifiera en rien votre prise en charge médicale ultérieure. Si vous acceptez de participer, la mention de votre non-opposition à la participation à cette étude sera mentionnée dans votre dossier médical. Une copie de cette lettre d'information vous sera remise.

Objectifs de l'étude

Le but de l'étude à laquelle nous vous proposons de participer est d'étudier le microbiote oral ainsi que les biomarqueurs inflammatoires salivaires chez des individus en bonne santé qui pratiquent de l'activité physique à des niveaux différents ; à terme cette étude pourrait aboutir à la proposition de signatures microbiologiques et immunologiques associées à la condition physique. Cette étude permettra également de réaliser une évaluation de l'état de santé bucco-dentaire pour mesurer l'impact de l'activité physique sur la santé orale.

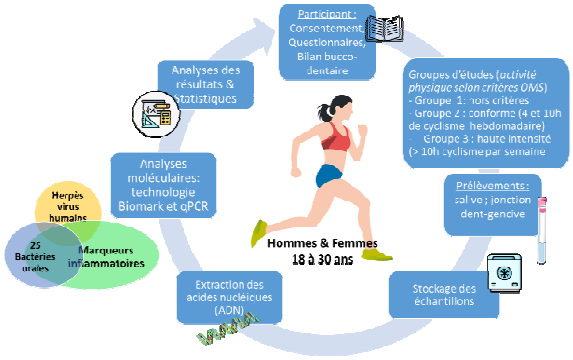


Figure 1 : Principales étapes du projet ORAMICAP

Les ADN des deux prélèvements salivaires seront extraits avec des kits adaptés (Blood Midi Kit, Qiagen). Le criblage des cibles microbiologiques sera réalisé grâce à une méthodologie innovante basée sur une PCR microfluidique (technologie BiomarkHD). Cette approche innovante permet d'analyser simultanément plusieurs dizaines de cibles au sein d'un même prélèvement biologique. Parmi les cibles, nous proposons de définir un panel cible constitué :

i) par les 8 virus du groupe des Herpès Virus Humains (HHV) qui infectent fortement les tissus de la cavité orale et se comportent comme des biosensors de la santé générale

ii) par un set de bactéries orales représentatif des états dysbiotiques et inflammatoires des biofilms oraux et des états sains de la muqueuse gingivale

Suis-je obligé(é) de participer ?

Votre participation à cette étude est entièrement libre et volontaire. Cette étude ne modifie pas les soins et les traitements qui vous seront dispensés.

Combien de personnes participeront à cette étude ?

Si vous décidez de participer à cette étude pilote prospective d'une durée de 30 mois, vous serez l'une des 200 personnes participantes à cette étude réalisée au sein du CHU de Nice et de l'Université Côte d'Azur.

Que dois-je faire si je participe ?

Si vous acceptez de participer à cette étude suite à nos explications, vous devrez signer une lettre de non-opposition. Suite à cela, nous vous demanderons de remplir un questionnaire portant sur vos habitudes sportives et alimentaires, sur votre santé générale et votre santé bucco-dentaire. Un bilan bucco-dentaire sera réalisé par la dentiste Dr Margaux Dubois à son fauteuil de consultation au sein du CHU de Nice, qui effectuera également des deux prélèvements salivaires non-invasifs qui sont sans douleurs (crachats salivaires et un écouvillonnage de la jonction dent-gencive). L'ensemble de votre participation à cette étude durera 1h30.

Quels sont les risques prévisibles de cette étude ?

Il n'y a pas de risque attendu à participer à cette étude.

Toutes les précautions nécessaires sont prises pour assurer la sécurité de vos données médicales personnelles, identifiées par un numéro de participation sans mention de vos noms et prénoms ou date de naissance. Les informations qui peuvent vous identifier sont présentes uniquement dans un répertoire sécurisé et seront détruites en fin d'étude. Les échantillons seront stockés au sein du laboratoire MICORALIS pour une durée maximale de 15 ans où ils pourront être utilisés pour d'autres recherches et seront détruits après cette durée.

Conformément à la législation française en vigueur, en particulier selon les dispositions de la Loi de Santé Publique et de la Loi n°2012-300 du 05/03/2012 dont le décret d'application n°2016-1537 est paru le 16/11/2016, le protocole a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personne 05/10/2022 Ce comité a pour mission de vérifier la pertinence scientifique de l'étude, les conditions requises pour votre protection et le respect de vos droits.

Quels sont les bénéfices liés à ma participation à cette étude ?

La participation à cette étude donne lieu à un bilan bucco-dentaire gratuit. Votre participation nous aidera grandement à mieux connaitre l'impact du sport sur le microbiote oral. Votre participation n'induit aucun risque éventuel.

Que se passera-t-il si je décide de me retirer de l'étude ?

Vous pouvez à tout moment décider de vous retirer de cette étude pour quelle que raison que ce soit, sans que cela ne modifie la relation que vous avez avec le médecin investigateur qui vous suit dans le cadre de cette étude. Si vous estimez, après nous avoir contactés, que vos droits informatiques et libertés ne sont pas respectés ou que vos données ne sont pas traitées conformément à la réglementation relative aux données personnelles, vous pouvez adresser une réclamation auprès de la Commission Nationale Informatique et Libertés : https://www.cnil.fr.

Ma participation à l'étude restera-t-elle confidentielle ?

Dans le cadre de la recherche médicale à laquelle le service vous propose de participer, un traitement de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière.

A cette fin, les données médicales vous concernant et les données relatives à vos habitudes et votre qualité de vie (âge, sexe, poids, taille, liste traitements, antécédents médicaux, consommation tabac, alcool, drogues, habitudes alimentaires, pratiques sportives), seront transmises au promoteur de la recherche ou aux personnes agissant pour son compte, en France. Ce recueil concerne vos données de santé et seront identifiées par un numéro rendant vos données anonymes.

Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises ou étrangères, à d'autres entités du CHU de NICE, hors UE. Le traitement de ces données est conforme à la loi Informatique et Libertés n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée et ainsi qu'au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 applicable à compter du 25 mai 2018 (règlement général sur la protection des données). La base juridique de ce traitement est l'intérêt légitime poursuivi par le CHU de Nice pour améliorer la prise en charge de cette pathologie.

Le responsable du traitement informatique est le Directeur Général du CHU de Nice. Le CHU de Nice a désigné un Délégué à la Protection des Données (DPO) que vous pouvez joindre au dpo@chu-nice.fr et qui pourra répondre à toutes vos questions concernant la protection des données personnelles.

Vous pouvez exercer votre droit d'accès et de rectification aux informations qui vous concernent, ou une limitation du traitement relatif à votre personne en écrivant au Délégué à la Protection des Données (DPO) du CHU de NICE. De même vous aurez le droit de vous opposer au traitement automatisé des données vous concernant et vous avez également le droit de porter une réclamation auprès de la Commission nationale Informatique et Libertés si vos données ne sont pas traitées conformément à la règlementation des données personnelles

Les données de l'étude pourront être publiées dans des journaux médicaux et scientifiques sans que votre identité soit révélée. Le promoteur est responsable du traitement des données de l'étude qui seront conservées 15 ans

Gestion des données et publication des résultats

Les données recueillies à l'occasion de cette recherche feront l'objet d'un traitement informatisé à des fins de saisie, d'analyse statistique et d'édition de résultats, coordonné et réalisé par le Centre Hospitalier Universitaire de Nice. Les résultats de l'étude pourront être publiés dans des revues scientifiques, mais votre identité ne sera jamais révélée. Vous pouvez être tenu(e) informé(e) des résultats globaux de la recherche une fois que celle-ci sera achevée, comme le prévoit l'article L1122-1 du code de la Santé Publique. Pour cela veuillez en faire la demande au médecin qui vous suit pour l'étude.

Nous vous remercions d'avoir pris connaissance de ce document et de votre éventuelle participation à l'étude. Si vous avez des questions, n'hésitez pas à les poser au médecin investigateur.

Contacts des investigateurs : Margaux.DUBOIS@univ-cotedazur.fr ou Morgane.ORTIS@univ-cotedazur.fr

«Etude pilote Sport et santé : Impact de l'activité physique sur l'homéostasie microbiologique de la cavité orale »

22-PP-11 n° 2022-A01682-41

Promoteur de l'étude : CHU de Nice - Département de la Recherche Clinique - 4, avenue Reine Victoria - BP 1179 - 06003 Nice Cedex1 – Tel : 04 92 03 40 11 - Fax: 04 92 03 40 75

Investigateur coordonnateur : Dr Margaux Dubois - Service Odontologie / Laboratoire MICORALIS – 5 rue du 22ème BCA, Campus St Jean d'Angély - 06000 Nice - Tel : 04.89.15.22.67

Expression de la non-opposition des patients pour l'utilisation des données à des fins de recherche

Afin d'exprimer votre choix, nous vous demandons de bien vouloir lire, cocher, dater, et signer dans le cadre réservé la non-opposition qui se trouve à la suite de cette note d'information. Vous avez la possibilité de demander un délai de réflexion et de poser toutes les questions relatives à cette démarche avant de prendre votre décision.

Votre « non-opposition » ne décharge pas les médecins de leurs responsabilités.

Vous conservez tous vos droits garantis par la Loi.

Vous acceptez que les données médicales vous concernant, enregistrées à l'occasion de cette étude, puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur de cette recherche.

Vous avez bien noté que le droit d'accès et de rectification de vos données personnelles prévu par la loi « Informatique et Libertés » s'exerce à tout moment auprès des responsables de cette étude par l'intermédiaire de votre praticien.

Vous pourrez, à tout moment, vous retirer de l'étude ou demander toute information complémentaire.

Quelle que soit votre décision, nous tenons à vous remercier de l'attention que vous avez portée à la lecture de ce document. Si vous ne souhaitez pas participer à ce projet, vous ne devez pas signer ce formulaire.

Nom …… Prénom …….
Adresse ……

Confirme :

☐ Ne pas m'opposer à l'utilisation de mes données anonymisées / échantillons associées dans le cadre de l'étude **ORAMICAP**

Des réponses ont été apportées à toutes mes questions. J'ai disposé d'un délai de réflexion avant de prendre ma décision.

Fait à . . . . . ,
le . . . . . le . . . . . .

Signature du médecin **Signature du patient**

Fait en deux exemplaires dont un remis au patient. 4