



UNIVERSITÉ DE TLEMCEN-ABOU-BEKR BELKAID

N° D'ordre

FACULTÉ DE MÉDECINE

MD 2019 / 001

DÉPARTEMENT DE MÉDECINE DENTAIRE



THÈSE

Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences Médicales

Présentée et soutenue publiquement par :

**Madame Ilham BEN-YELLES**

Intitulée :

**Essai thérapeutique en *ex vivo* de l'astaxanthine sur les  
métalloprotéinases 9 et 13 impliquées dans la maladie  
cariéuse et maladie parodontale chez les enfants âgés  
entre 12 et 15 ans scolarisés à Tlemcen**

JURY :

***Président***

**Pr. Sid Ahmed SERRADJ**

Université d'Oran 1

***Membres du jury :***

**Pr. Nadia GHODBANE**

Université de Constantine

**Pr. Latifa HENAOUI**

Université de Tlemcen

**Pr. Mourad ARIBI**

Université de Tlemcen

***Directeur :***

**Pr. Mohamed BOUZIANE**

Université d'Oran 1

***Co-directeur :***

**Pr. Rachid SID**

Université de Annaba

Année 2018-2019

UNIVERSITÉ DE TLEMCEM- ABOU-BEKR BELKAID

N° D'ordre

F A C U L T É D E M É D E C I N E

MD 2019 / 001

DÉPARTEMENT DE MÉDECINE DENTAIRE



THÈSE

Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences Médicales

Présentée et soutenue publiquement par :

**Madame Ilham BEN-YELLES**

Intitulée :

**Essai thérapeutique en *ex vivo* de l'astaxanthine sur les  
métalloprotéinases 9 et 13 impliquées dans la maladie  
cariéuse et maladie parodontale chez les enfants âgés  
entre 12 et 15 ans scolarisés à Tlemcen**

JURY :

***Président***

**Pr. Sid Ahmed SERRADJ**

Université d'Oran 1

***Membres du jury :***

**Pr. Nadia GHODBANE**

Université de Constantine

**Pr. Latifa HENAOUI**

Université de Tlemcen

**Pr. Mourad ARIBI**

Université de Tlemcen

***Directeur :***

**Pr. Mohamed BOUZIANE**

Université d'Oran 1

***Co-directeur :***

**Pr. Rachid SID**

Université de Annaba

Année 2018-2019

## Remerciements

*Au président de Jury, Monsieur Sid Ahmed SERRADJ*, professeur en Odontologie Conservatrice et Endodontie. Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de notre admiration et de notre profond respect.

*A notre juge, Madame Nadia GHODBANE*, Professeure en Odontologie Conservatrice et Endodontie, Vous nous faites l'honneur de siéger au jury de notre thèse. Nous sommes sensibles à l'attention que vous avez bien voulu porter à ce travail. Soyez assuré de notre profond respect.

Mes sincères remerciements vont à *Madame Latifa HENAOUI*, Professeure en Epidémiologie, en acceptant d'être dans notre jury, merci Madame d'avoir su répondre à mes interrogations.

J'exprime ma sincère reconnaissance à *Monsieur Mourad ARIBI*, Professeur en Immunologie, vous nous avez fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury .

Mes plus grands remerciements et ma reconnaissance vont ensuite naturellement, à *mon directeur de thèse Professeur Mohamed Bouziane*, qui a su orienter judicieusement mon travail tout en me laissant la liberté de faire mes propres choix ; je lui suis reconnaissante pour sa confiance et sa disponibilité, son parainage scientifique et financier à travers son Laboratoire de Biomatériaux et Technologie et l'aide qu'il m'a apportée, par les remarques et conseils pertinents qu'il m'a adressés tout au long de ce travail.

*A Professeur Rachid SID*, pour son engagement dans le co-encadrement de ma thèse. Sa participation aux discussions de fond, ses suggestions éclairées et ses critiques honnêtes, son enthousiasme et ses encouragements auront été pour moi essentiels ; Je vous remercie pour votre patience, votre rigueur, votre disponibilité pendant la réalisation de cette thèse.

*J'exprime aussi ma sincère reconnaissance au Docteur Abdellah Boukli responsable de la section hygiène scolaire et Docteur Omar Sari, directeur du centre de santé, ainsi que tous les directeurs des écoles qui m'ont facilité le travail à leurs niveaux.*

*Je tiens aussi à exprimer ma sincère gratitude à mes maîtres, particulièrement Madame la Professeure Djamila Bouziane pour son soutien et ses conseils durant la réalisation de ce projet*

## Dédicaces

Je dédie ce travail à

*Ma chère mère*, Toi qui m'as toujours soutenu, de ma plus tendre enfance jusqu'à maintenant avec tous les sacrifices consentis par ta présence dans ma vie. Je te dédie cette thèse.

*A Mon Papa*, Je te remercie de m'avoir transmis l'envie d'apprendre et le goût de la réussite. Jamais je n'oublierai tes encouragements pour arriver jusqu'au bout.

*A mon cher époux Hamed*, merci d'avoir apporté un sens à ma vie et qui a œuvré à la finalisation de ce travail. Aussi modeste soit-il, reçois l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

*A mes frères, belles sœurs et mes neveux* qui ont contribué à ma réussite, merci d'apporter votre joie et amour à ma vie et d'être là pour moi.

*A mon cher mon Oncle Lotfi et sa femme Meriem* particulièrement qui m'ont toujours encouragé et m'ont apporté leur tendresse pendant mon cursus de résidanat.

*A mes ami(es)*, particulièrement Warda, Zineb, Nawal et Lotfi ainsi que tous mes collègues particulièrement à Souhila, Besma, Zahra, Nassima, Téma et Imene et toutes les personnes que j'estime.

A notre chère *secrétaire médicale Atika Bendimered*, j'exprime toute ma reconnaissance pour son aide technique et ma gratitude pour son soutien.

## Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>I</b>
<b>DEDICACES</b>	<b>III</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>XV</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b>	<b>XVIII</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : REVUE DE LA LITTERATURE</b>	<b>5</b>
<b>1. INFECTIONS DENTAIRES</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Maladie carieuse</b>	<b>5</b>
1.1.1 Définitions	5
1.1.2 Epidémiologie	5
1.1.2.1 Prévalence de la maladie carieuse	5
1.1.2.1.2 Au niveau national	7
1.1.2.2 Unité de mesure de la maladie carieuse	8
1.1.2.2.1 Indice dents cariées, obturées absentes des dents permanentes (CAOD)	8
1.1.2.2.2 Indice CAOF	8
1.1.2.2.3 Indice CAO	8
1.1.2.2.4 Indice SIC	8
1.1.3.4 Principaux facteurs de risque	10
1.1.3.4.1 Susceptibilité de l'hôte	10
1.1.3.4.1.1 L'organe dentaire	10
1.1.3.4.1.2 Les paramètres salivaires	11
1.1.3.4.2 Les bactéries cariogènes	12
- Les streptocoques	12
- Les lactobacilles	13
1.1.3.4.3 L'alimentation	13
1.1.3.4.3.1 Voie homofermentaire	13
1.1.3.4.3.2 Voie hétérofermentaire	13
1.1.3 Mécanisme de la lésion carieuse	14
1.1.3.1 Théories pathogéniques	14
1.1.3.1.1 Théorie interne	14
1.1.3.1.2 Théorie protéolytique de Gottlieb (1944-1947)	14
1.1.3.1.3 Théorie de Schartz	15
1.1.3.1.4 Théorie acidogénique	15
1.1.3.2 Le mécanisme de lésion carieuse	15
1.1.3.2.1 Déminéralisation	16
1.1.3.2.2 Reminéralisation	16

<b>1.2. Maladie parodontale</b>	<b>17</b>
1.2.1 Définition	17
1.2.2 Epidémiologie	17
1.2.2.1 Prévalence	17
1.2.2.2 Les Indices épidémiologiques d'évaluation du risque parodontal	17
1.2.2.2.1 Les indices d'hygiène : (mesure de dépôts dentaires)	18
- Indice d'hygiène orale simplifiée : « OHIS : oral hygiene index simplified »	18
1.2.2.2.2 Les indices d'inflammation	19
- Indice gingival (Iøe et Silness, 1967) « Gingival index »[GI]	19
1.2.3 Origine	19
1.2.3.1 La présence de bactéries pathogènes	19
1.2.3.2 L'absence de bactéries protectrices	20
1.2.3.3 Environnement dentogingival adéquat	20
1.2.3.4 Défaillance acquise ou innée de l'hôte	20
1.2.3.5 L'évaluation du risque parodontal	20
1.2.3.5.1 Facteurs liés au patient	21
- Contrôle de plaque	21
- Age	21
- Tabac	21
- Diabète	22
1.2.3.5.2 Facteurs liés à la dent	22
- Position de la dent au niveau de l'arcade	22
- Restaurations iatrogènes	22
- Altération de la réponse de l'hôte	22
- Risque génétique	22
- Stress	23
1.2.4 Mécanisme de lésion parodontale	23
1.2.4.1 La réaction inflammatoire	23
1.2.4.2 La lésion débutante	24
1.2.4.3 La lésion établie	24
1.2.4.4 La parodontite	24
<b>2. MACROPHAGE</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Définition</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Origine</b>	<b>25</b>
2.2.1 Métalloprotéinases	26
2.2.2 Cytokines	26
2.2.2.1 Interleukine Beta -1	26
2.2.2.2 Interleukine-6	26
2.2.2.3 Interleukine -10	27
2.2.2.4 TNF-Alpha	27
<b>2.3 Mécanisme d'activité du macrophage</b>	<b>27</b>
2.3.1 Polarisation du macrophage	27
2.3.1.1 Les macrophages classiquement activés ou M1	27
2.3.1.2 Les macrophages alternativement activés ou M2	27
2.3.2 Activation du macrophage	28
2.3.2.1 Modes d'activation du macrophage	28

2.3.2.2 Rôle du macrophage dans la résolution de la réponse inflammatoire et infectieuse	29
2.3.2.2.1 Monoxyde d'azote	30
- Définition du monoxyde d'azote	30
- Voie de synthèse du monoxyde d'azote par le macrophage	30
- Effets du monoxyde d'azote	31
- Rôles physiologiques du monoxyde d'azote	31
2.3.2.2.2 Peroxyde d'hydrogène	32
- Définition	32
- Rôles du peroxyde d'hydrogène	32
2.3.2.2.3. Superoxyde dismutase	33
- Définition de la superoxyde dismutase	33
- Rôle de la superoxyde dismutase	33
2.3.2.2.4 Activité de l'arginase	34
- Définition de l'arginase	34
- Réaction de l'arginase dans le macrophage	34
- Balance arginase / iNOS	34
2.3.2.2.5 Activité de la Catalase	35
- Définition	35
- Rôles de la catalase	35
2.3.2.2.6 Les activités métaboliques du macrophage	35
- Le Calcium	35
- Le Glucose	36
- Le Cholestérol	36
<b>3. METALLOPROTEINASES</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Définition</b>	<b>36</b>
3.1.1 Structure	37
<b>3.2 Origine</b>	<b>37</b>
<b>3.3 Mécanisme d'action des métalloprotéinases dans les infections dentaires</b>	<b>39</b>
3.3.1 Rôle dans le processus carieux	39
3.3.2 Rôle dans l'inflammation pulpaire	40
3.3.3 Rôle dans l'inflammation parodontale	40
<b>4. L'ASTAXANTHINE</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Définition</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Origine</b>	<b>42</b>
<b>4.3 Mode d'action</b>	<b>43</b>
4.3.1 Effets antioxydants	43
4.3.2 Effets anti inflammatoires	44
4.3.3 Effets anti tumoraux	44
4.3.4 Activité anti-apoptotique de l'AST	44
4.3.5 Activité immunomodulatrice de l'AST	45
<b>5. PROBLEMATIQUE</b>	<b>47</b>
<b>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES</b>	<b>54</b>
<b>1. TYPE DE L'ETUDE</b>	<b>54</b>
<b>2. OBJECTIFS</b>	<b>54</b>
<b>2.1 Principal</b>	<b>54</b>



<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>85</b>
<b>1. EFFET DE L'ASTAXANTHINE SUR LE BURST RESPIRATOIRE AU NIVEAU DU MACROPHAGE</b>	<b>85</b>
1.1 Effet de l'astaxanthine sur le monoxyde d'azote libéré par le M $\phi$	85
1.2. Effet de l'astaxanthine sur la production du péeroxyde d'hydrogène	86
1.3 Effet de l'astaxanthine sur l'activité de superoxyde dismutase	86
<b>2. EFFET DE L'ASTAXANTHINE SUR L'ACTIVITE DE LA CATALASE</b>	<b>87</b>
<b>3. EVALUATION DES PARAMETRES METABOLIQUES CHEZ LE MACROPHAGE</b>	<b>87</b>
<b>3.1. Effet de l'astaxanthine sur le calcium</b>	<b>87</b>
3.1.1 Effet de l'astaxanthine sur le calcium intracellulaire	87
3.1.2 Effet de l'astaxanthine sur le calcium extra cellulaire	88
<b>3.2. Effet de l'astaxanthine sur le taux de glucose</b>	<b>89</b>
3.2.1 Effet de l'astaxanthine sur le glucose intracellulaire	89
3.2.2 Effet de l'astaxanthine sur le glucose extracellulaire	89
<b>3.3 Effet de l'astaxanthine sur le taux de cholestérol</b>	<b>90</b>
<b>4. EVALUATION DES MARQUEURS PRO ET ANTI-INFLAMMATOIRES DE LA POLARISATION M1 /M2</b>	<b>90</b>
<b>4.1 Polarisation du macrophage vers le profil pro-inflammatoire M1</b>	<b>90</b>
4.1.1 Production des cytokines	90
4.1.1.1 Effet de l'astaxanthine sur les IL-1 $\beta$	91
4.1.1.2 Effet de l'astaxanthine sur les IL-6	91
4.1.1.3 Effet de l'astaxanthine sur le TNF- $\alpha$	92
4.1.2 Evaluation de l'activité enzymatique de iNOS	93
<b>5. EVALUATION DE LA POLARISATION DU MACROPHAGE VERS LE PROFIL ANTI INFLAMMATOIRE M2</b>	<b>93</b>
5.1 Effet de l'astaxanthine sur la production de l'interleukine IL-10	93
5.2 Effet de l'astaxanthine sur l'activité de l'arginase	94
<b>6. PRODUCTION DES METALLOPROTEINASES</b>	<b>95</b>
6.1 Effet de l'astaxanthine sur la production des métalloprotéinases 9	95
6.2 Effet de l'astaxanthine sur la libération des métalloprotéinases 13	96
<b>2. PARTIE EPIDEMIOLOGIQUE</b>	<b>96</b>
<b>2.1 DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON</b>	<b>96</b>
2.1 Répartition de la population selon l'âge	98
2.2 Répartition des deux maladies selon le sexe	98
2.3 Répartition des affections bucco-dentaires selon la zone	99
2.4 Répartition des deux maladies selon le niveau socio-économique	99
<b>3. REPARTITION DES PARAMETRES DE L'HYGIENE ORALE</b>	<b>100</b>
3.1 Fréquence des maladies selon le nombre de brossage	100
3.2 Répartition de la qualité de l'hygiène orale chez les deux maladies	101
<b>4. ETUDE DES HABITUDES ALIMENTAIRES</b>	<b>101</b>
4.1 Répartition de la fréquence du grignotage dans la population d'étude	101
4.2 Répartition de la fréquence de l'alimentation sucrée dans la population d'étude	102
<b>5. ETUDE DES PARAMETRES SALIVAIRES</b>	<b>102</b>
5.1 Répartition du pH en fonction de la présence de la maladie carieuse et parodontale	102
5.2 Répartition de la viscosité en fonction de la présence des deux maladies	103
5.3 Répartition du débit salivaire en fonction de la présence de la maladie carieuse et la maladie parodontale	103

---

<b>5.4 Répartition de l'Indice de plaque de la population d'étude</b>	<b>104</b>
<b>5.5 Répartition de l'Indice CAO Moyen selon des classes d'âge et sexe</b>	<b>104</b>
<b>6. ETUDE DE FACTEURS DE RISQUES</b>	<b>105</b>
<b>6.1 Analyse uni variée</b>	<b>105</b>
6.1.1 Caractéristiques socio démographiques	106
6.1.2 Caractéristiques liées à l'hygiène orale	108
6.1.3 Caractéristiques liées aux habitudes alimentaires	109
6.1.4 Caractéristiques liées aux facteurs salivaires	109
<b>6.2. Analyse multivariée</b>	<b>110</b>
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b>	<b>112</b>
<b>CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS</b>	<b>133</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>137</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>154</b>
<b>ANNEXE A . AUTORISATION DE L'ACADEMIE DE TLEMCEN</b>	<b>154</b>
<b>ANNEXE B. CONSENTEMENT ECLAIRE</b>	<b>155</b>
<b>ANNEXE C. FICHE D'OBSERVATION CLINIQUE</b>	<b>156</b>
<b>ANNEXE D. ANALYSE SANGUINE</b>	<b>158</b>
<b>ANNEXE E , INDICE DE POSITION SOCIOECONOMIQUE</b>	<b>161</b>

## Liste des abréviations

### A

ADA : Association dentaire américaine .

AST : Astaxanthine.

ATCD : Antécédents.

ATP : Adénosine-Triphosphate.

### C

Ca<sup>2+</sup> : Calcium.

CAO : Indice des dents cariées(C), absentes(A), obturées(O).

CAOD : Indice de nombre de face de dents permanentes cariées(C), Absentes(A), obturées(O).

CD : Cluster de différenciation .

CHOL : Cholestérol.

CHX : Chlorehexidine.

COX-1 : Cyclooxygénase-1.

CPA : Cellule présentatrice d'antigène.

CR : Complement receptor.

CRP : C-réactive protéine.

CSF : Cell stem factor.

Cu : Cuivre.

### D

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DMFT : Decayed missing filled teeth.

DMFS : Decayed missing filled surface .

DCPD : Phosphate dicalcique dihydraté .

### E

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique.

ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.
eNOS	: endothelial nitric oxide synthase.
EPS	: Polysaccharides extracellulaires.
EPSP	: Etablissement public de santé de proximité.
ERK	: Extracellular signal-regulated kinases.
<b>F</b>	
FDA	: Food and Drug Administration.
Fe	: Fer.
<b>G</b>	
GI	: Gingival index.
Glu	: Glucose.
GM-CSF	: Granyocyte monocyte cell stem factor.
GsF	: Growth stimulatory factor.
GTF	: Glycosyltransférase .
<b>H</b>	
HbA1c	: Hémoglobine glyquée.
H2O2	: Peroxyde d'hydrogène (l'eau oxygénée) .
HLA-DR	: Human leukocyte antigen, de classe II.
<b>I</b>	
IC 95%	: Intervalle de confiance à 95%.
IL	: Interleukine.
IFN $\gamma$	: Interféron gamma .
iNOS	: Inductible nitrique oxide synthase.
IgE	} : Immunoglobuline E/A/G/M.
IgA	
IgG	
IgM	

**L**

LPS : Lipopolysaccharide.

**M**

M-CSF : Monocyte cell stem factor.

MDM : Macrophages dérivés de monocytes .

MEC : Matrice extra cellulaire.

MMP-13 : Métalloprotéinase Matricielle 13 ou collagénase 3.

MMP-9 : Métalloprotéinase matricielle 9 ou gélatinase B.

MMPs : Métalloprotéinases matricielles.

Mn : Manganèse.

MnCl<sub>2</sub> : Chlorure de manganèse (II).

Mφ : Macrophage.

**N**

NF-κB : Nuclear factor-kappa B.

NHANES : National Health and Nutrition Examination Survey.

Nickel : Nickel .

NK : Natural Killer.

nNOS : Neurale Nitric oxide Synthase.

NO : Nitric oxyde, monoxyde d'azote.

NOS : Nitric oxide synthase.

**O**

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

OHIS : Oral Hygien Index Simplified.

O<sub>2</sub> : Oxygène.

**P**

- PAE : Pellicule Aquisée exogène.
- PBMCs : Peripheral blood mononuclear cell, cellules mononuclées du sang périphérique.
- PBS : Phosphate-Buffered Saline.
- pH : Potentiel hydrogène.
- PNN : Poly nucléaire neutrophile.
- PCR : Polymerase chain reaction.
- PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern .
- PRR : Pattern recognition receptor.
- PGE : Prostaglandine.

**R**

- RCI : Risque carieux individuel.
- RMPI : Roswell Park Memorial Institute medium.
- ROS : Reactif species oxygène, espèces réactives à l'oxygène.

**S**

- SIC : Signifiant caries index.
- SIDA : Syndrome d'immunodéficience Acquise.

**T**

- TGF- $\beta$  : Tumoral growth factor beta.
- Th : Lymphocyte halper.
- TLR : Toll like receptor.
- TNF $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale, *tumor necrosis factor alpha*.
- Tris-HCl : Trishydroxyméthylaminométhane, chlorure d'hydrogène, acide Chlorhydrique.

**U**

UDS : Unité de dépistage et de suivi.

**V**

VIH : Virus de l'immunodéficience humain.

**W**

WH : Whitlockite.

---

## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Potentiel cariogénique de différentes bactéries en fonction des sites carieux	12
<b>Tableau II:</b> Principaux glucides fermentescibles de l'alimentation	14
<b>Tableau III :</b> Classification of MMPs.	38
<b>Tableau IV :</b> Répartition du CAO moyen selon les classes d'âge et sexe	105
<b>Tableau V :</b> Analyse uni variée des facteurs socio démographiques liés à la maladie carieuse et parodontale	107
<b>Tableau VI:</b> Analyse uni variée des paramètres de l'hygiène orale liés à la maladie carieuse et parodontale	108
<b>Tableau VII:</b> Analyse uni variée des habitudes alimentaires liés à la maladie carieuse chez les enfants scolarisés âgés de 12 à 15 ans durant l'année 2015-2016.	109
<b>Tableau VIII:</b> Analyse uni variée des facteurs salivaires liés à la maladie carieuse	109
<b>Tableau IX:</b> Etude des facteurs associés avec la maladie carieuse : Analyse multivariée	111
<b>Tableau X:</b> Résultats de l'analyse multivariée : Etude de l'association des facteurs de risque de la maladie parodontale	111

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Le diagramme de KEYES 1962	9
<b>Figure 2:</b> Schéma de Keyes, revu par Newbrun.	9
<b>Figure 3:</b> Diagramme causal de la carie dentaire	10
<b>Figure 4 :</b> Equilibre déminéralisation-reminéralisation en raison d'une neutralisation de l'acide due au pouvoir tampon de la salive	15
<b>Figure 5:</b> Stades de maturation des phagocytes mononucléaires.	25
<b>Figure 6:</b> Polarisation du macrophage	28
<b>Figure 7:</b> Les différents modes d'activation du macrophage	29
<b>Figure 8:</b> La production du NO par le macrophage.	31
<b>Figure 9:</b> Réaction de l'arginase au sein du macrophage	34
<b>Figure 10 :</b> Organisation des domaines des différents types de MMPs	37
<b>Figure 11:</b> Structure chimique de l'AST	42
<b>Figure 12:</b> Le mécanisme proposé par lequel l'astaxanthine inhibe le dysfonctionnement mitochondrial induit par le stress oxydatif et le développement et la progression des maladies	46
<b>Figure 13:</b> Recueil de la salive	60
<b>Figure 14:</b> Mesure du pH de l'ensemble des échantillons	61
<b>Figure 15:</b> Dosage protéinique par la méthode de Gornell	61
<b>Figure 16:</b> Lecture des densités optiques avec le lecteur ELISA Biochrom Anthos2020	62
<b>Figure 17 :</b> Récolte de sang périphérique.	63
<b>Figure 18:</b> Dilution du sang par le PBS	64
<b>Figure 19:</b> Récupération de l'anneau avec les PBMC	64
<b>Figure 20:</b> Lavage des cellules	65
<b>Figure 21:</b> Mise en suspension cellulaire dans la cellule Malasez	66
<b>Figure 22 :</b> Vue microscopique des cellules pour comptage	67
<b>Figure 23 :</b> Activation des macrophages par le LPS et GMCSF	67
<b>Figure 24:</b> Supplémentation de l'astaxanthine sur les macrophages adhérents	68
<b>Figure 25:</b> Stockage des puits de surnageants et de lysats cellulaires pour le dosage	69
<b>Figure 26:</b> Dosage des protéines totales	70
<b>Figure 27:</b> Lecture de l'absorbance par le lecteur ELISA	71
<b>Figure 28:</b> Dosage du monoxyde d'azote	72
<b>Figure 29:</b> Dosage du peroxyde d'hydrogène	73
<b>Figure 30:</b> Dosage de l'activité superoxyde dismutase	74
<b>Figure 31:</b> Dosage de l'activité de la catalase	75
<b>Figure 32:</b> Dosage du calcium intra et extra cellulaire	76
<b>Figure 33:</b> Dosage du glucose intra et extra cellulaire	76

<b>Figure 34:</b> Dosage du cholestérol	77
<b>Figure 35:</b> Dosage des interleukines : l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, TNF- $\alpha$	78
<b>Figure 36:</b> Dosage de l'interleukine 10	79
<b>Figure 37:</b> Dosage de l'activité arginase	80
<b>Figure 38:</b> Dosage des Métalloprotéinases 9 et 13	81
<b>Figure 39:</b> Effet de l'astaxanthine sur la production du monoxyde d'azote	85
<b>Figure 40:</b> Effet de l'astaxanthine sur le peroxyde d'hydrogène	86
<b>Figure 41:</b> Effet de l'astaxanthine sur la production du SOD par le macrophage	86
<b>Figure 42:</b> Effet de l'astaxanthine sur l'activité de catalase	87
<b>Figure 43:</b> Effet de l'astaxanthine sur la production du calcium intra cellulaire	88
<b>Figure 44:</b> Effet de l'astaxanthine sur le calcium extra cellulaire	88
<b>Figure 45:</b> Effet de l'astaxanthine sur le glucose intra cellulaire	89
<b>Figure 46:</b> Effet de l'astaxanthine sur le glucose extracellulaire	89
<b>Figure 47:</b> Effet de l'astaxanthine sur la production du Cholestérol par le macrophage	90
<b>Figure 48:</b> Effet de l'astaxanthine sur la production des IL-1 $\beta$	91
<b>Figure 49:</b> Effet de l'astaxanthine sur la production des IL6	91
<b>Figure 50:</b> Effet de l'astaxanthine sur le taux de TNF-Alpha	92
<b>Figure 51:</b> Dosage de l'activité NOS	93
<b>Figure 52:</b> Effet de l'astaxanthine sur l'interleukine 10	94
<b>Figure 53:</b> Effet de l'astaxanthine sur l'activité de l'arginase	94
<b>Figure 54:</b> Effet de l'astaxanthine sur la libération des MMP-9 par les macrophages	95
<b>Figure 55:</b> Effet de l'astaxanthine sur la libération des MMP13 par les macrophages	96
<b>Figure 56:</b> Description de l'échantillon enquêté	97
<b>Figure 57:</b> Répartition de la population selon l'âge	98
<b>Figure 58:</b> Répartition des deux maladies selon le sexe	98
<b>Figure 59:</b> Répartition des affections bucco dentaires selon les zones (urbaines et rurales)	99
<b>Figure 60:</b> Statut socio-économique de la population	99
<b>Figure 61:</b> Fréquence des maladies selon le nombre de brossage	100
<b>Figure 62:</b> Répartition de qualité de l'hygiène orale chez les deux maladies	101
<b>Figure 63:</b> Répartition de la fréquence du grignotage selon la population	101
<b>Figure 64:</b> Répartition de la fréquence de l'alimentation sucrée dans la population	102
<b>Figure 65:</b> Répartition du pH en fonction de la présence de la maladie carieuse et parodontale	102
<b>Figure 66:</b> Répartition de la viscosité salivaire en fonction de la présence des deux maladies	103
<b>Figure 67:</b> Répartition du débit salivaire sur toute la population	103
<b>Figure 68 :</b> Répartition de l'indice de plaque de la population d'étude	104

## Liste des annexes

<b>Annexe A .</b> Autorisation de l'académie de Tlemcen	154
<b>Annexe B.</b> Consentement éclairé	155
<b>Annexe C.</b> Fiche d'observation clinique	156
<b>Annexe D.</b> Analyse sanguine	158
<b>Annexe E .</b> Indice de position socioéconomique	161

## Introduction

L'organe dentaire est une entité physiologique, composée de l'odonte et de son parodonte; la dent et ses tissus de soutien sont confrontés à un environnement complexe en équilibre précaire, en raison des modifications qui s'y produisent en permanence : variations des paramètres salivaires, prises alimentaires, plaque dentaire...

Cependant, il est soumis à des agressions potentiellement pathogènes qui peuvent se traduire par l'apparition des lésions carieuses et parodontales, ces affections font partie des maladies les plus répandues dans le monde, et font l'objet d'un motif de consultation fréquent. Elles touchent toutes les tranches d'âge.

La maladie carieuse est définie comme une maladie infectieuse, transmissible<sup>[1], [2]</sup> pandémique des tissus durs de la dent résultant de la présence de certaines bactéries cariogènes dans la cavité orale<sup>[3], [4]</sup>telles que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* et les Lactobacilles, qui produisent des acides à la suite d'une consommation individuelle de sucre<sup>[5]</sup>.

Ces acides, principalement l'acide lactique, diffusent à travers les tissus dentaires calcifiés et réduisent le pH local à 5,5, ce qui entraîne la dissolution des cristaux minéraux<sup>[6]</sup>.

La maladie carieuse concerne plus de 80% de la population mondiale, 60 à 90% des enfants d'âge scolaire et près de 100% des adultes.

Durant ces vingt dernières années, la prévalence de la carie dentaire a connu un déclin dans les pays développés mais reste un problème buccodentaire majeur dans les pays sous-développés tel que le Sénégal avec un taux de 41,8%<sup>[7]</sup> et les pays en voie de développement comme l'Inde avec un taux de 49,8%<sup>[8]</sup>, le Soudan 65,5%<sup>[6]</sup>, la Tunisie 64,5%<sup>[10]</sup>, ainsi que le Mexique avec un taux supérieur à 95%<sup>[7]</sup>, enfin dans les pays développés comme la Chine, on note un taux de 43.6% et 35% respectivement chez les enfants dont la moyenne d'âge est de 12 ans environ<sup>[8]</sup>.

De même pour la maladie parodontale dont la prévalence chez ces mêmes populations varie dans les différentes régions du monde, avec un taux élevé de 98% au Pakistan, 91% d'enfants en Roumanie<sup>[9]</sup>, 45% en Afrique noire incluant Nigeria, Sénégal, Côte d'Ivoire, Ghana, Mauritanie, Togo et Sierra Leone ainsi que d'autres pays du continent africain<sup>[9]</sup>.

Cette incidence est liée directement au changement du mode de vie, des habitudes alimentaires<sup>[6]</sup>, ainsi que la difficulté d'accès aux services de soins buccodentaires, notamment dans les pays sous-développés et à l'accroissement démographique très important.

Les données nationales sur la prévalence de la maladie carieuse et la maladie parodontale des enfants dont la tranche d'âge est comprise entre 12 et 15 ans à Tlemcen sont actuellement très limitées.

Par ailleurs, des barrières physiques telles que les tissus durs de la dent et la barrière chimique : la salive sont mis en jeu pour protéger la dent contre les bactéries responsables du développement de la maladie carieuse<sup>[10]</sup>. Ces bactéries cariogènes buccales sont les *Streptocoques mutans* et les *Lactobacilles*.

Elles transforment les glucides alimentaires en acides, cette agression est amplifiée par de nombreux facteurs de risque biologiques, ces acides entraînent la chute du pH de la plaque dentaire et causent un déséquilibre de la balance reminéralisation /démminéralisation, par conséquent la dissolution de l'émail, et la dentine mise à nue est plus vulnérable à l'attaque bactérienne<sup>[11]</sup>.

En effet, la dentine renferme 70% de matière minérale, 10% d'eau et 20% de charge organique répartie en protéines collagéniques : collagène de type 1 et 2 et trame non protéinique type : métalloprotéinases (MMP)-9 dans un état latent. Lors d'une acidité élevée, ces enzymes subissent un clivage et s'activent en dégradant le collagène de la dentine<sup>[12]</sup>, le processus inflammatoire se trouve ainsi déclenché<sup>[13]</sup>.

Par ailleurs, les macrophages, cellules de l'immunité innée peuvent être divisés en deux sous-populations principales : le macrophage classique M1, Il induit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires tels que l'interféron -Gamma (IFN $\gamma$ )<sup>[14]</sup> et les MMP-9, par contre le macrophage M2 alternative produisent des médiateurs anti-inflammatoires comme l' interleukine -4 (IL-4), et sert à la résolution de l'inflammation<sup>[15]</sup>.

Afin de contribuer à remédier à l'insuffisance des données sur la carie dentaire aux jeunes âges, une partie de ce travail consiste en un essai thérapeutique préclinique, qui a pour objectif de montrer l'effet de l'astaxanthine (AST) sur l'activité du macrophage humain qui tend à juguler l'infection bactérienne générée par la flore bactérienne de la maladie

carieuse et parodontale, par inhibition de l'action des métalloprotéinases responsables des deux infections.

Par la suite, la seconde partie de ce travail tend à évaluer la prévalence de la carie dentaire et la maladie parodontale et d'étudier leur relation avec le niveau socio-économique, l'hygiène de vie et les habitudes alimentaires ainsi que la variabilité des différents paramètres salivaires (pH, pouvoir tampon, débit, viscosité, et concentration protéinique).

Pour ce faire, ce travail est divisé en plusieurs chapitres :

Le premier chapitre sera consacré aux différents rappels et à la revue de littérature en abordant plusieurs volets :

- Un rappel fondamental sur les deux infections orales à savoir la maladie carieuse et parodontale, en abordant leur prévalence, et les facteurs étiologiques ainsi que leur mécanisme pathogénique.
- Un rappel fondamental sur la cellule immunitaire, le macrophage, définitions, ses sécrétions, activités métaboliques, rôles dans l'infection et la réponse inflammatoire.
- Un rappel sur les enzymes protéolytiques, les métalloprotéinases et leurs rôles dans les infections orales.
- Puis sur l'astaxanthine, produit utilisé pour inhiber l'action des métalloprotéinases.

Le deuxième chapitre aborde en premier lieu la partie expérimentale décrivant la culture cellulaire ainsi que les différents dosages effectués et en deuxième lieu le déroulement de l'étude du profil épidémiologique des deux maladies, ainsi que l'association des facteurs de risque.

Le troisième chapitre est consacré aux résultats obtenus et leur analyse.

Le quatrième chapitre : aborde la discussion.

Le cinquième chapitre, sera consacré à une conclusion globale et une proposition des perspectives.

# **Chapitre 1**

## **Revue de la littérature**

## Chapitre 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 1. Infections dentaires

#### 1.1 Maladie carieuse

##### 1.1.1 Définitions

Durant ces dernières décennies plusieurs auteurs ont essayé de définir le terme « carie dentaire ».

La lésion est définie comme une altération spécifique de la dent, progressant de la périphérie vers le centre ; le processus carieux représente d'une manière fondamentale la manifestation d'un déséquilibre entre les ions de calciums et les ions phosphates présents dans les tissus dentaires et salivaire.

Ce déséquilibre serait dû à l'action des microorganismes de la plaque bactérienne, influencés par certains facteurs nommés déterminants écologiques [16].

D'autres auteurs, ont défini récemment la maladie carieuse comme une maladie infectieuse de la dent, qui survient après une lésion de l'émail, suivie d'une atteinte de la dentine puis de la pulpe [17].

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini la carie comme étant « un processus pathologique localisé, d'origine externe, apparaissant après l'éruption dentaire, qui s'accompagne d'un ramollissement des tissus durs et évoluant vers la formation d'une cavité » [18], [19].

##### 1.1.2 Epidémiologie

###### 1.1.2.1 Prévalence de la maladie carieuse

La maladie carieuse demeure un important problème de santé publique et un bon indicateur d'un mauvais état général bucco-dentaire chez les enfants [20], classée comme étant le 4<sup>ème</sup> fléau mondial après les cancers, les maladies cardio-vasculaires et le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ; la maladie carieuse touche toutes les tranches d'âges et n'épargne aucun individu. Cette lésion chronique, la plus répandue dans le monde affecte les enfants d'âge scolaire de 60 % à 90%.

### 1.1.2.1.1. Au niveau international

Les données des enquêtes sur la santé dentaire des enfants âgés de 5, 8, 12 et 15 ans au Royaume-Uni, entre 2003 et 2013, sur une population défavorisée a montré un taux de lésions carieuses significativement plus élevé en 2013 (35,8% en 2013 contre 26,0% en 2003<sup>[21]</sup>).

Les données provenant d'une étude menée à Stockholm, en Suède depuis 2003 jusqu'à 2016, sur 65 259 enfants montrent que 5,5% des enfants avaient des lésions carieuses à 3 ans, augmentant à 18% à l'âge de 7 ans<sup>[20]</sup>.

Plusieurs études en Asie ont évalué le taux des lésions carieuses, selon les directives de l'OMS ; l'enquête réalisée sur 425 enfants d'âge préscolaire à Bhubaneswar, Odisha (Inde) a jugé un taux de 47,29%<sup>[22]</sup> ; d'autre part, dans une autre étude faite au Sri Lanka, la prévalence était de 32,1%<sup>[23]</sup>, un taux de 35,55% des enfants âgés de 12 ans ayant suivi un programme national de santé orale dans plusieurs régions de la Chine a été rapporté<sup>[24]</sup>.

Bien qu'une étude transversale représentative menée en 2017, auprès d'enfants âgés de sept à douze ans, fréquentant des écoles publiques et privées de la ville de Diamantina, au Brésil ai révélé un taux de 53,2%<sup>[25]</sup>, en parallèle l'enquête nationale sur la santé et la nutrition (NHANES) réalisée entre 2015 et 2016, a estimé un taux de 45,8% des caries dentaires totales non traitées, sur dents lactéales ou permanentes chez les jeunes de 2 à 19 ans avec prévalence de 21, 4%, 50,5% et 53, 8% au niveau des tranches d'âge respectives de 2 à 5 ans, 6 à 11 ans et de 12 à 19 ans aux Etats Unis<sup>[26]</sup>.

En revanche, les chiffres trouvés en Afrique montraient qu'auprès d'une enquête faite sur quatre cent cinquante adolescents en 2012 et 2013 dans des lycées publiques de la ville de Rabat, au Maroc ; trois cent quatre-vingt-sept (387) d'entre eux avaient au moins une dent cariée non traitée et cent soixante et onze (71) d'entre eux avaient au moins une dent restaurée<sup>[27]</sup> ; Par ailleurs, selon Abid la prévalence et la gravité des maladies bucco-dentaires semblent augmenter dans la région africaine, la prévalence des caries dentaires est moins grave dans la plupart des pays africains que dans les pays développés, mais le taux élevé de caries non traitées reflète les ressources limitées disponibles et les difficultés d'accès aux services de soins dentaires.

Les données ont estimé un indice dents carieés, obturées et absentes (CAO) de 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,5 - 0,6 - 0,6 - 0,9 et de 1,1 dans les pays suivants : Tanzanie, Gana, Sudan , Nigéria, Sénégal, Kenya ,Sud d'Afrique et le Gabon<sup>[28]</sup>.

#### 1.1.2.1.2 Au niveau national

En dehors de quelques études parcellaires, la situation des affections bucco-dentaires en région du Maghreb et notamment en Algérie reste insuffisamment explorée.

Quelques données extraites des résultats des études de la prévalence des maladies buccodentaires à l'ouest algérien en 1977-1978 ; sur total de 3505 sujets examinés âgés de 6-25 ans, ont révélé un nombre moyen de CAOD allant de 4,26 à 6 ans, à 4,29 à 7 ans et à 4,34 à 8 ans<sup>[29]</sup>, par ailleurs, l'enquête réalisée par Benkaaloul menée sur 391 enfants en âge préscolaire en 1987, rapporte un indice CAO, de 2,9 ; 4,1 ;5,1 des enfants âgés de 3,4 et 5 ans<sup>[30]</sup>.

L'étude sur la prévalence de la maladie carieuse faite en 1987 sur des enfants et adolescents âgés entre 7 à 15ans, à Constantine révèle un CAO qui varie entre  $0,32 \pm 0,77$  pour la tranche de 7 à 9 ans jusqu'à  $3,52 \pm 3,75$  pour la tranche de 13 à 15 ans<sup>[31]</sup>, d'une autre part une étude réalisée à Annaba sur un suivi de 03 ans de 1525 enfants, rapporte un taux de 79,38% et de 78,63% % respectivement chez les enfants de 6 et 12 ans en 2005, cette prévalence baisse en 2008 à 77,75% pour les 6 ans et de 67,72% pour les enfants de 12 ans<sup>[32]</sup>.

De plus, l'étude menée sur 3000 enfants âgés entre 6 et 17ans dans la wilaya de Sidi Belabbes en 2011, révèle une fréquence de 57,1% et un indice CAO de 3 pour la tranche d'âge 6-11 ans et de 1,46 pour les enfants âgés entre 12 et 17 ans<sup>[33]</sup>, une enquête à Arzew sur environ 300 adolescents âgés de 12 à 15 ans entre 2012 et 2013, rapporte que deux tiers (68%) des adolescents présentaient au moins une dent permanente cariée, en moyenne 1,93(IC : 1,91 - 1,99) dent cariée et un CAO moyen de 2,29(IC : 2,03 – 2,56)<sup>[34]</sup>, ainsi que l'étude menée à Ain Témouchent sur 401 enfants participants, un taux estimé à 76,1% l'indice carieux CAOD moyen est de  $3,22 \pm 6,28$  ( $0,37 \pm 1,84$  à un an vs  $4,153 \pm 0,64$  à quatre ans)<sup>[35]</sup>, l'étude faite sur 700 enfants âgés de 7 et 13 ans de la ville d'Oran en 2016, rapporte un tau de maladie carieuse qui dépasse les 65%<sup>[36]</sup>.

### 1.1.2.2 Unité de mesure de la maladie carieuse

#### 1.1.2.2.1 Indice dents cariées, obturées absentes des dents permanentes (CAOD)

L'indice dents cariées (C), absentes (A), obturées (O) CAOD, a été mis au point par Klein et Palmer en 1930 et utilisé par l'OMS, il détermine la somme des dents cariées, extraites et obturées<sup>[12]</sup>.

Cet indice mesure les antécédents carieux de la dentition permanente. Il représente l'indicateur de référence pour mesurer l'incidence de la carie chez un sujet<sup>[12]</sup>.

Sa valeur est de  $0 \leq \text{CAOD} \leq 28$  ( les troisièmes molaires ne sont pas incluses) <sup>[28], [37]</sup>.

#### 1.1.2.2.2 Indice CAO F

L'indice CAO F ( Dents cariées , obturées, absentes par face), représente toujours le nombre de dents permanentes cariées (C), obturées (O), absentes (A), on distingue cinq faces pour les dents postérieures et quatre pour les dents antérieures, ce qui fait un nombre de 128 faces<sup>[12]</sup> .

Cependant, cet indice ne prend pas en considération les lésions amélaire, en plus d'être fastidieux dans leurs mises .aux points <sup>[12], [38]</sup> .

#### 1.1.2.2.3 Indice CAO

C'est la somme des dents cariées, extraites, obturées sur le nombre total des personnes examinées.

Le C exprime le besoin de soin, (traitements des caries), le A et O correspondent au passé de la maladie carieuse (dents extraites ou restaurées pour cause de maladie) <sup>[12], [38]</sup>.

#### 1.1.2.2.4 Indice SIC

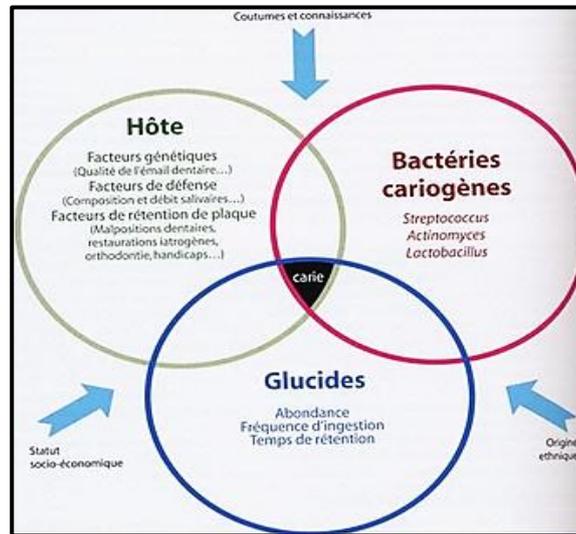
L'indice SIC (Signifie : Caries Index) mis au point par l'OMS, il représente le CAOD moyen du tiers de la population ayant un indice CAOD le plus élevé<sup>[12]</sup>.

### 1.1.3 Origine de la maladie carieuse

Plusieurs schémas ont été proposés pour expliquer les causes principales de la maladie carieuse :

### 1.1.3.1. Diagramme de Keyes

En 1959, Keyes a mis en évidence les trois principaux facteurs de la carie dentaire à savoir : la susceptibilité de l'hôte, des bactéries spécifiques à la carie dentaire et une alimentation riche en sucre (Figure 1).

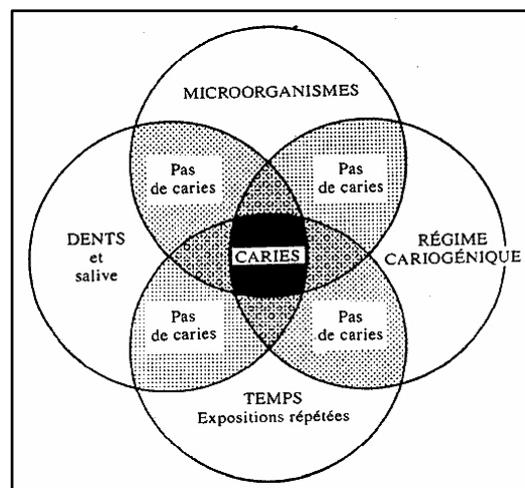


Source : Amélioration de l'hygiène buccodentaire par le conseil en officine. Le 11 Décembre 2015 p n 65 Eve TREBOSC ROUCH , 2015.

Figure 1: Le diagramme de KEYES 1962

### 1.1.3.2 Schéma de Newbrun

Ce n'est qu'en 1978 que le facteur « temps » a été rajouté König, un temps suffisamment long est nécessaire afin que ces éléments inter-agissent, la carie dentaire ne se manifeste qu'en présence de ces quatre facteurs, elle peut être inactivée en l'absence de l'un d'eux<sup>[1]</sup> (Figure 2).



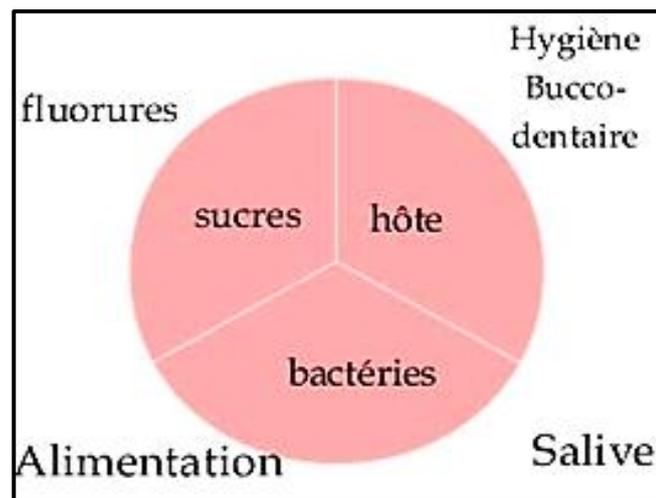
Source: Cariology. 2e édition, Ed. Wilkins et Wilkins, p17-8 ,1980.

Figure 2: Schéma de Keyes, revu par Newbrun.

### 1.1.3.3 Diagramme causal de la carie dentaire d'après BOKHOUT et COLL (2000)

Bokhout et coll ont proposé un modèle regroupant les causes suffisantes pour l'installation de processus carieux, c'est à dire l'ensemble minimal des conditions et des événements qui produisent inévitablement la maladie.

La carie ne peut survenir que si ses trois composants étiologiques sont réunis : les bactéries cariogènes, les sucres fermentescibles et la dent (Figure 3).



Source : <https://fr.slideshare.net/AbdeldjalilGadra/colloque-la-carie-dentaire>

**Figure 3: Diagramme causal de la carie dentaire d'après BOKHOUT et Coll (2000)**

### 1.1.3.4 Principaux facteurs de risque

#### 1.1.3.4.1 Susceptibilité de l'hôte

##### 1.1.3.4.1.1 L'organe dentaire

Etant un site électif de la lésion, plusieurs facteurs sont à prendre en considération notamment les anomalies de la denture : des sillons trop profonds et très difficiles à nettoyer, les malpositions dentaires, le port de prothèse dentaire ou encore les appareillages orthodontiques, le degré et la qualité de la minéralisation, une dent moins exposée au fluor et la dent déciduale résistante moins aux à la déminéralisation. Tous comme la qualité de la minéralisation, tous ces facteurs sont un risque accru dans l'apparition de la carie dentaire<sup>[12], [39], [40]</sup>.

### 1.1.3.4.1.2 Les paramètres salivaires

#### - Débit salivaire

Un débit salivaire moyen est compris entre 0,25 et 0,35 mL/mn. Il peut passer rapidement à 3mL/min durant sa stimulation. Ce flux permet la lubrification des aliments qui passent rapidement dans le tube digestif, il participe aussi à l'action d'auto nettoyage des dents.

Une augmentation du débit salivaire entraînera une diminution à l'exposition des acides et des sucres, si par contre le débit se retrouve réduit, il accroîtra le potentiel cariogène des aliments<sup>[40]</sup>.

#### - pH salivaire

Dans des conditions optimales, le pH salivaire varie entre 6,7 et 7,3 ; cependant il peut diminuer et atteindre 5,3 durant l'ingestion d'aliments riches en sucres fermentescibles, ce qui peut susciter une grande susceptibilité à la carie dentaire<sup>[41]</sup>.

#### - Pouvoir tampon

Le pouvoir tampon assure la neutralisation des acides produits par les bactéries de la plaque dentaire, cependant il dépend du renouvellement salivaire mais aussi de la sécrétion du gaz carbonique produit par les glandes salivaires.

L'augmentation du gaz dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) diminue le pH et augmente le pouvoir tampon, favorisant le développement de certains micro-organismes. La salive des personnes exemptes de caries contient plus d'oxygène que celles qui présentent des processus carieux<sup>[12], [41], [42]</sup>.

#### - Les Matrices Métallo Protéinases (MMP's)

Retrouvées dans les odontoblastes, la pulpe et la dentine, et même dans la salive, ces enzymes sont capables de dégrader des substrats extracellulaires tel que le collagène, et par conséquent participer à la cariogénèse car les bactéries acidophiles sont incapables de dégrader le collagène in vitro.

Les MMP's vont se cliver avec la diminution du pH et vont s'activer. Quand le pH devient neutre, elles vont pouvoir dégrader la matrice dentaire déminéralisée<sup>[43], [44]</sup>.

### 1.1.3.4.2 Les bactéries cariogènes

L'implication des micro-organismes buccaux dans le processus carieux a été appréhendée par Miller en 1980. De multiples travaux, ont mis en évidence la spécificité cariogène des deux grandes familles de bactéries au sein de la plaque dentaire : les streptocoques et les lactobacilles<sup>[4], [5], [11]</sup>.

Un grand nombre d'espèces bactériennes issues de la salive et de la plaque est associé aux lésions carieuses, (Tableau I). Cependant les trois espèces bactériennes considérées comme particulièrement pathogènes restent : les streptocoques (STR) (environ 50% des bactéries), les lactobacilles (20%) et les actinomyces (2%)<sup>[12]</sup>.

**Tableau I: Potentiel cariogénique de différentes bactéries en fonction des sites carieux**

	Surfaces lisses	Fosses et sillons	Surfaces radiculaires	Dentine
<b>Lactobacillus</b>	-	++	-	++
<b>S. mutans</b>	+++	+++	++	+
<b>S. sanguinis</b>	-	+	+	-
<b>S. salivarius</b>	-	+	+	-
<b>S. mitis</b>	-	+	-	-
<b>Enterocoques</b>	-	+	-	-
<b>Actinomyces</b>	-	+	+	++

Source : J. Lasfargues, Odontologie conservatrice et restauratrice. Tome 1, , 2009 p. 150

#### - Les streptocoques

Les streptocoques mutans ont été découverts par Koch en 1920 et depuis ils ont été liés à l'étiologie principale de la carie dentaire, on les retrouve principalement dans le pharynx, les intestins et dans la bouche<sup>[45]</sup>.

Les streptocoques mutans et sorbinus sont des bactéries acidophiles, sont capables de former des polysaccharides extracellulaires (EPS) en présence de saccharose de fructose, et de glucose<sup>[42-44]</sup>.

### - Les lactobacilles

Les lactobacilles sont producteurs d'acide fort, les lactobacilles paracasei sont des bactéries cariogènes par excellence avec leurs capacités de s'adhérer aux surfaces dentaires rugueuses<sup>[49]</sup>.

Des études ont également démontré que la maladie carieuse n'est pas due à un organisme isolé tel que *Streptococcus mutans* ou le *Lactobacille*, mais elle est plus polymicrobienne. Des études ont identifié une flore très variée, telle que les *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Granulicatetta*, *Scardovia* *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Actinomyces* et *Leptotrichia* dans les caries de l'émail. Les *Streptococcus sanguinis*, *Atopobium*, *Schlegelella*, *Pseudoramibacter* et *Lactobacillus* ont également été identifiés<sup>[50]</sup>.

#### 1.1.3.4.3 L'alimentation

La prise régulière des sucres et en dehors des repas empêcheraient les systèmes tampons salivaires de fonctionner et créaient un environnement propice à la déminéralisation<sup>[51]</sup>. Les glucides sont soit stockés en intra-cellulaire ou extra-cellulaire par la bactérie, soit catabolisés en acides organiques, dont le plus actif est l'acide lactique.

##### 1.1.3.4.3.1 Voie homofermentaire

Par la voie homofermentaire et l'activation de la lactico-déshydrogénase, le saccharose produit de grandes quantités d'acide lactique ce qui entraîne secondairement la déminéralisation de l'émail<sup>[12]</sup>.

##### 1.1.3.4.3.2 Voie hétérofermentaire

Lorsque la consommation des glucides fermentescibles est limitée, des acides organiques moins déminéralisants<sup>[52]</sup> tels que l'acide acétique, l'acide formique, l'acide propionique et l'acide butyrique sont préférentiellement produits par les bactéries qui adoptent un métabolisme de type hétérofermentaire<sup>[12]</sup>.

Dans notre alimentation moderne, les sucres proviennent de nombreuses sources et sont apportés sous trois formes : monosaccharides (glucose, fructose, et galactose), disaccharides (saccharose, maltose et lactose et glucides complexes (amidon, glycogène) (Tableau II)<sup>[53]</sup>.

**Tableau II: Principaux glucides fermentescibles de l'alimentation  
(d'après Chardin et al, 2006)**

Saccharides	Type de glucides	Types d'aliments
<i>Monosaccharides</i>	Glucose	Confiseries, miel, blé boissons sucrées
	Fructose	Gâteaux, miel, fruits, boissons fruitées
<i>Disaccharides</i>	Saccharose	Sucre de table, confiseries, chocolat, desserts fruités, boissons sucrées, céréales du petit-déjeuner...
	( glucose + fructose)	
<i>Polysaccharides</i>	Amidon (chaînes de glucose)	Farine, semoule, pains, biscottes, pâtisseries

**Source :** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p 239-290 (Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994)

### 1.1.3 Mécanisme de la lésion carieuse

#### 1.1.3.1 Théories pathogéniques

##### 1.1.3.1.1 Théorie interne

Selon cette théorie émise par plusieurs auteurs (Fores, Hund 1950, De Vries, Rheinwald, Cservenvei) en 1956 : le processus carieux serait dû à des troubles de la pulpe et de la dentine, tissus vivants. Cette théorie n'explique pas les caries des dents dépulpées<sup>[54]</sup>.

##### 1.1.3.1.2 Théorie protéolytique de Gottlieb (1944-1947)

Cette théorie s'appuie sur le fait que les ferments protéolytiques des micro-organismes attaqueraient tous d'abord les constituants organiques de l'email ce qui engendrera par la suite la décalcification qui en serait secondaire.

Cette théorie explique tous simplement que la protéolyse facilite la pénétration de l'acide<sup>[54]</sup>.

### 1.1.3.1.3 Théorie de Schartz

La carie est une infection des dents, le germe progresse dans les plus fines ramifications organiques. Les unes et les autres subissent une dégradation enzymatique et parmi les produits de cette réaction sont les « chélateurs »<sup>[55]</sup>.

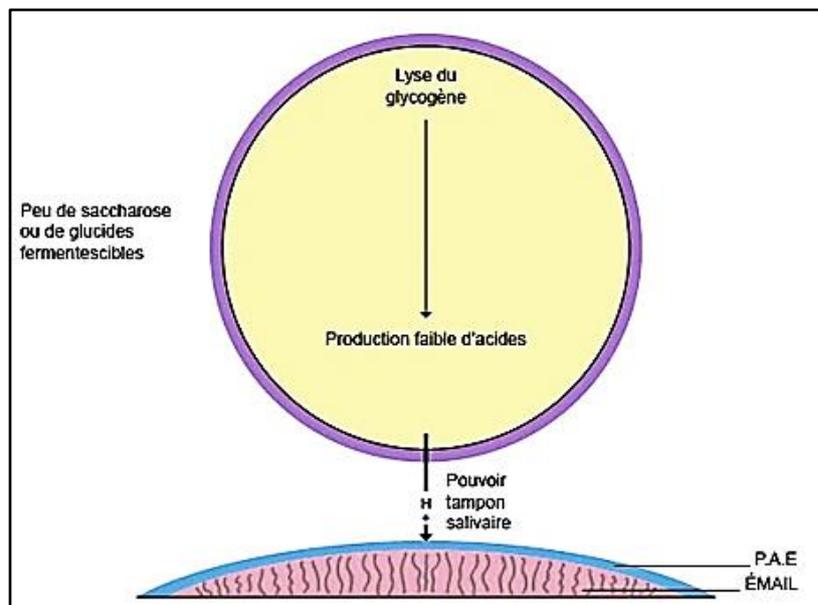
### 1.1.3.1.4 Théorie acidogénique

Cette théorie est la plus communément admise aujourd'hui, Miller a proposé cette théorie: la carie va débuter par la décalcification de l'émail puis de la dentine par des acides d'origine bactérienne<sup>[56]</sup>.

### 1.1.3.2 Le mécanisme de lésion carieuse

La carie implique l'interaction de bactéries capables de produire des acides, d'un substrat métabolisable par ces bactéries et de facteurs liés à l'hôte, incluant la dent et son environnement salivaire au cours du temps<sup>[57]</sup>.

Ces bactéries produisent des acides organiques faibles, sous-produits de la fermentation des glucides, qui provoquent une chute locale du pH en dessous d'un seuil critique entraînant la déminéralisation des tissus dentaires calcifiés (Figure 6).



Source <http://www.unsof.org/media/bacterio/html/cours-N11544-5.html> décembre 2018

**Figure 4 : Equilibre déminéralisation-reminéralisation en raison d'une neutralisation de l'acide due au pouvoir tampon de la salive**

Si la perte du phosphate, du calcium et du carbonate se poursuit, le phénomène de cavitation s'installe. Au début de la lésion, le phénomène est réversible, par réincorporation de calcium, de phosphate et de fluorures<sup>[1], [12]</sup>.

Le fait que la lésion carieuse ainsi déclenchée progresse, s'arrête ou régresse dépend de la balance déminéralisation/reminéralisation. Chez un individu, ce processus bipolaire de déminéralisation (destruction) et de reminéralisation (réparation) se produit au cours de la journée et fait que la lésion soit déclenchée, progresse, s'arrête ou régresse. L'évolution dépend de l'agressivité du biofilm, de l'inversion du processus avec réparation si le biofilm est inhibé, ou encore vers le statu quo<sup>[12], [40], [58]</sup>.

#### **1.1.3.2.1 Déminéralisation**

La déminéralisation est régie par le fait que les composés minéraux obéissent au principe du produit de solubilité, le composé ayant la plus faible constante de dissociation (Valeur de pK) contrôle la réaction. La Whitlockite (WH) et le phosphate dicalcique dihydraté (DCPD) qui présentent des constantes de dissociation faible, se dissolvent préférentiellement. La dissolution des autres phases en particulier l'hydroxyapatite est toujours secondaire<sup>[59]</sup>.

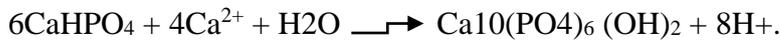
La déminéralisation n'est pas seulement un processus univoque mais une cascade de réactions de dissolution-précipitation-recristallisation.

Les phosphates de calcium sont métastables et une fois dissous engendrent de nouvelles réactions. La couche absorbée aurait tendance à former une nouvelle couche de surface moins perméable et moins soluble, favorisant le ralentissement et l'arrêt de la dissolution. Ainsi dès qu'une lésion initiale apparaît, elle tend de façon intrinsèque à la passivation et à la réversibilité<sup>[12], [60]</sup>.

#### **1.1.3.2.2 Reminéralisation**

Entre les périodes de haute activité métabolique conduisant à des productions acides, les conditions du pH redeviennent favorables, tendant vers la neutralité. Les ions calcium et phosphate provenant de la salive et de la plaque diffusent alors vers l'émail au niveau duquel ils peuvent participer à la reminéralisation. Les phosphates de calcium les moins stables vont évoluer vers des compositions plus stables.

La taille des cristaux en surface peut s'accroître jusqu'à la normale, et dans la lésion, le phosphate dicalcique peut être transformé en apatite, cela pouvant être schématisé par la réaction suivante :



L'importance de la reminéralisation dépend de la neutralité des ions  $\text{H}^+$  par les tampons carbonate et phosphate de la salive ayant diffusé vers l'émail et du degré de supersaturation des composants minéraux des solutions dans le biofilm et dans les pores de l'émail [12], [40], [60].

## 1.2. Maladie parodontale

### 1.2.1 Définition

Les maladies parodontales sont des pathologies infectieuses, multifactorielles<sup>[61]</sup>. On regroupe sous ce terme : les gingivopathies limitées aux tissus parodontaux superficiels et les parodontolyses touchant les tissus parodontaux profonds , l'évolution de la lésion en absence de traitement aboutit à la perte spontanée de la dent, résultat de la destruction des tissus de soutien des dents<sup>[62]</sup>.

### 1.2.2 Epidémiologie

#### 1.2.2.1 Prévalence

Des études épidémiologiques ont montré que chez les enfants et adolescents la gingivite est plus répandue que les formes de parodontites.

Des résultats après plusieurs enquêtes montrent que la prévalence varie entre 30-89% ,ce taux dépend de la qualité d'hygiène orale et la motivation des enfants ; par exemple presque la moitié d'un échantillon d'enfants afro-américains âgés entre 10 à 13 ans présentent des indicateurs déterminants pour le diagnostic de la Parodontite (PA) suite à un examen de réaction en chaîne par polymérase (PCR), une étude menée à Porto Ricco, révèle un taux de 80,41% des enfants avec gingivites avec une prédominance masculine<sup>[63]</sup>, une autre enquête chez 625 élèves âgés entre 3 à 15 à Bamako, présente des atteintes de parodontopathies de l'ordre de 87,84% en 2018 .

#### 1.2.2.2 Les Indices épidémiologiques d'évaluation du risque parodontal

Ils permettent d'évaluer la présence ou non de tartre et le degré d'inflammation gingivale.

### 1.2.2.2.1 Les indices d'hygiène : (mesure de dépôts dentaires)

#### - Indice d'hygiène orale simplifiée : « OHIS : oral hygiene index simplified »

L'indice de Green et Vermillion est calculé en additionnant les scores de tartre et de débris mous et on les divisant par le nombre de surfaces dentaires examinées<sup>[64]</sup>.

#### *Les indices de débris mous sont :*

0 : Absence de débris ou de tâches.

1 : Présence de débris mous couvrant jusqu'au tiers de la surface dentaire.

2 : Présence de débris mous couvrant entre le tiers et les deux tiers de la surface dentaire.

3 : Présence de débris mous couvrant plus des deux tiers de la surface dentaire.

#### *Les indices de tartre sont :*

0 : Absence de tartre.

1 : Tartre supra gingival ne couvrant pas plus du tiers de la surface dentaire.

2 : Tartre supra gingival couvrant entre le tiers et les deux tiers de la surface dentaire.

3 : Tartre supra gingival couvrant plus des deux tiers de la surface dentaire ou bande continue de tartre sous-gingival.

#### - Indice de plaque

Ce paramètre de Silness et Løe permet d'évaluer la quantité des dépôts mous (la plaque et le tartre) présents sur la surface dentaire, d'apprécier aussi l'hygiène bucco dentaire et la qualité de l'élimination de la plaque<sup>[64]</sup>.

#### *Les indices sont :*

0 : Absence de dépôts près de la gencive.

1 : Présence de plaque non visible à l'œil nu, seulement en passant la sonde sur la surface de la dent.

2 : Accumulation d'une couche fine à modérée de plaque, dans une poche parodontale, sur les bords de la gencive et/ou sur la surface dentaire adjacente.

3 : Accumulation abondante de plaque sur les bords gingivaux et la surface dentaire adjacente.

#### 1.2.2.2 Les indices d'inflammation

##### - Indice gingival (Iöe et Silness, 1967) « Gingival index »[GI]

C'est un paramètre semi-quantitatif, permet de mesurer la sévérité et la localisation des gingivites<sup>[64], [65]</sup>.

*Les scores sont définis ainsi :*

0 : Gencive saine, pas de signe d'inflammation clinique.

1 : Légère inflammation, absence de saignement au sondage, léger érythème et œdème.

2 : Inflammation modérée, avec érythème, œdème, et saignement au sondage.

3 : Inflammation sévère, avec érythème, œdème important, tendance à l'ulcération et à l'hémorragie spontanée.

#### 1.2.3 Origine

L'aboutissement à la destruction parodontale avec ou sans poches requiert la réunion en même temps d'un certain nombre de conditions inspirées du modèle de Sokransky qui sont nécessaires, mais non suffisantes en elles-mêmes afin d'engendrer des dommages tissulaires. Quatre d'entre elles sont décrites dans la littérature <sup>[66]</sup>.

##### 1.2.3.1 La présence de bactéries pathogènes

La flore buccale de l'hôte abrite de nombreuses espèces bactériennes, certaines font partie de la flore commensale compatible avec la santé parodontale du milieu buccal, et peuvent par moment devenir virulents par l'augmentation de leur nombre ou influencées par d'autres espèces, alors que d'autres, sont considérées d'emblée responsables de la perte d'attache dans certaines parodontites : *Aggregatibacter*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros* et les *Treponema denticola* par leur capacité d'envahir les tissus parodontaux profonds<sup>[67]</sup>.

### 1.2.3.2 L'absence de bactéries protectrices

La présence des bactéries en proportion suffisante est indispensable dans la maintien de la santé parodontale, elles sont considérées comme antagonistes aux bactéries saccharolytiques dont certaines espèces comme les *Streptocoques* s'opposent aux *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregati bacter actinomycetemcomitans* et les *Spirochètes* au sein du biofilm bactérien<sup>[68]</sup>.

### 1.2.3.3 Environnement dentogingival adéquat

La différence de profil entre les bactéries aérobies et anaérobies, sous-entend qu'elles nécessitent deux milieux spécifiques et adéquats compatibles avec leur croissance et multiplication<sup>[69]</sup>.

Les variations de certains facteurs physiques comme le potentiel d'oxydation, la pression osmotique et la température conditionnent à fortiori leurs habitats ; par conséquent, l'accumulation de tartre et le saignement issu de l'inflammation est en faveur de la croissance des souches virulentes<sup>[70]</sup>.

### 1.2.3.4 Défaillance acquise ou innée de l'hôte

Les polymorphonucléaires et les monocytes constituent les moyens de défenses de l'hôte contre l'infection, en cas où leur nombre ou fonctions sont altérés, ou au cours de certaines maladies générales tel que : la neutropénie, les agranulocytoses, les aplasies médullaires, l'envahissement des tissus parodontaux profonds est facilité par les agents agresseurs<sup>[71]</sup>.

De même, un dysfonctionnement des monocytes peut être constaté par une surproduction d'interleukines (IL-1 $\beta$ ) génétiquement chez certains individus, ou peut être acquis par la surconsommation de tabac<sup>[64]</sup>.

### 1.2.3.5 L'évaluation du risque parodontal

Selon l'Académie Américaine de Parodontologie, l'évaluation du risque permet d'estimer la probabilité de survenue d'évènements indésirables par des évaluations qualitatives et quantitatives, le risque en parodontologie s'apprécie à travers la combinaison de plusieurs paramètres ; ceci permet l'identification précoce des personnes concernées et la mise en œuvre des moyens de prévention<sup>[62]</sup>.

### 1.2.3.5.1 Facteurs liés au patient

#### - Contrôle de plaque

Il représente l'élément le plus déterminant du risque parodontal, l'évaluation du risque d'accumulation de la plaque bactérienne est très significative car son rôle dans l'étiopathogénie n'est plus à démontrer.

Par ailleurs, le brossage biquotidien participe à la réduction de la charge microbienne, et par conséquent le maintien de la santé parodontale<sup>[62]</sup>.

#### - Age

Certaines atteintes parodontales sont étroitement liées à l'âge, comme le syndrome de Papillon-Lefèvre chez l'enfant, la parodontite juvénile localisée chez l'adolescent, la parodontite à progression rapide chez le jeune adulte. Une corrélation étroite a été remarquée entre le vieillissement et la prévalence des maladies parodontales. De plus, la sévérité des maladies parodontales augmente avec l'âge. Les séquelles des maladies parodontales s'accumulent avec le temps et font de l'âge un facteur de risque important de présence et de sévérité de ces maladies<sup>[72]</sup>.

Les patients polymédiqués sont sujets à une réduction du flux salivaire, de plus l'hygiène est négligée chez ces sujets et participe à l'apparition de la maladie parodontale<sup>[73]</sup>.

#### - Tabac

Aujourd'hui, la consommation du tabac est admise par de nombreux auteurs comme un facteur de risque de survenue et de progression de la maladie parodontale.

Les effets du tabac sont dose-dépendants, le risque est de 2,5 à 6 fois plus fréquent chez les fumeurs.

On constate une perte clinique plus importante de l'attache épithéliale, de lyses osseuses, et un risque accru de récessions gingivales chez les fumeurs, mais il est tout à fait sournois car les manifestations cliniques sont moins marquées que chez les non-fumeurs ; une réponse inflammatoire réduite, une hyposialie et un fluide gingival moins important lié à l'interaction avec la nicotine qui stimule la libération d'adrénaline<sup>[74]</sup>.

### - Diabète

Les sujets diabétiques ont une plus grande prévalence de la maladie parodontale, le mécanisme d'action de cette maladie chronique s'explique par trois théories : vasculaire, immunologique et collagénique, le maintien de la santé parodontale est axé sur un équilibre glycémique adéquat [75].

#### 1.2.3.5.2 Facteurs liés à la dent

##### - Position de la dent au niveau de l'arcade

Toute malposition, malocclusion ou encombrement dentaire influence l'hygiène, en conséquence la maturation de la plaque bactérienne, source de perte d'attache et de lyse osseuse [62].

##### - Restaurations iatrogènes

Les reproductions de l'aspect anatomique des dents, le respect des limites cervicales, ainsi que l'espace biologique, par les obturations et les restaurations prothétiques ; sont les conditions clefs du maintien de l'intégrité de l'organe dentaire et son parodonte [62].

##### - Altération de la réponse de l'hôte

La réponse de l'hôte est déterminante dans la gérance des infections microbiennes par l'intervention de l'immunité non spécifique et spécifique. Fait important, la dégradation de l'état général par certaines maladies comme : les leucémies, l'agranulocytose, la thrombocytopénie, les troubles leucocytaires, entraîne une déficience de l'immunité favorisant la destruction parodontale [61].

##### - Risque génétique

Parmi les principaux facteurs incriminés dans les maladies parodontales, le défaut de chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et des macrophages est fréquemment évoqué. Des études de distribution de la parodontite juvénile localisée (PJU chez des jumeaux et chez des frères et sœurs ont confirmé son caractère familial. L'étude sur 47 familles a mis en évidence un mode de transmission autosomique récessif ; Le même mode de transmission a été suggéré pour les parodontites prépubertaires [76].

## - Stress

Le stress est la réponse psychosomatique d'un organisme devant la perception d'un défi ou d'une menace, la composante agit sur le parodonte soit par voie systémique soit par voie locale, en alternant ses défenses immunitaires, et en développant des parafunctions compensatoires causant des préjudices directs sur le parodonte, c'est-à-dire que l'adaptation individuelle au stress est plus impliquée dans la genèse de la pathologie<sup>[61]</sup>.

### 1.2.4 Mécanisme de lésion parodontale

Lors de maladies parodontales, l'équilibre est rompu : les bactéries parodontopathogènes à prédominance Gram négatif (*Porphyromonas gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tanerella denticola*, *Bactéroïde forsythus*) vont se multiplier. Ces bactéries se développent au sein du biofilm<sup>[77], [78]</sup>.

L'accumulation de plaque va entraîner une gingivite qui, par stades successifs, se transformera en parodontite et le nombre et la distribution des micro-organismes changent et la réponse inflammatoire se déclenche<sup>[79]</sup>.

#### 1.2.4.1 La réaction inflammatoire

Elle débute entre le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour qui suit l'agression bactérienne (en l'absence de mesures d'hygiène). La réaction inflammatoire se produit dans le tissu conjonctif situé sous l'épithélium de jonction. Une réaction vasculaire s'établit lorsque la gencive est agressée par des bactéries. Les lymphocytes T (CD4+ et CD8+) viennent lutter contre les bactéries avec le soutien des mastocytes et des macrophages qui produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ ), facteur de nécrose tumorale (TNF)), des métalloprotéinases (MMPs), la Prostaglandine 2 (PGE2) et l'IL-8. Ceci augmente la production de fluide gingival ainsi que la migration de polynucléaires neutrophiles (PNN) du tissu gingival vers la cavité buccale<sup>[77], [80]</sup>.

L'Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) est une cytokine issue du macrophage lorsqu'il a réagi avec une bactérie. Elle induit une résorption osseuse et la sécrétion de certaines protéases. Cette cytokine augmente avec l'inflammation gingivale<sup>[81]</sup>.

Le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) est lui produit par les lymphocytes activés et les monocytes, retrouvé dans le fluide gingival et certains sites parodontaux, il s'agit d'un puissant immunorégulateur pouvant stimuler les fibroblastes et la résorption osseuse<sup>[82]</sup>.

#### 1.2.4.2 La lésion débutante

Elle apparaît entre le 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour, on constate majoritairement des lymphocytes T, mais également un nombre important de neutrophiles, qui ont la particularité de disloquer l'architecture cellulaire provoquant une altération de l'épithélium de jonction gingivo-dentaire<sup>[77]</sup>.

#### 1.2.4.3 La lésion établie

Les lymphocytes B et les plasmocytes prédominent, l'oedème tissulaire favorise la formation d'une flore bactérienne sous gingivale, le sillon gingivo-dentaire s'approfondit en formant des poches. Cet état peut subsister pendant une période indéfinie, des mois voire des années sans évoluer en parodontite, en fonction de l'hôte<sup>[77], [83]</sup>.

#### 1.2.4.4 La parodontite

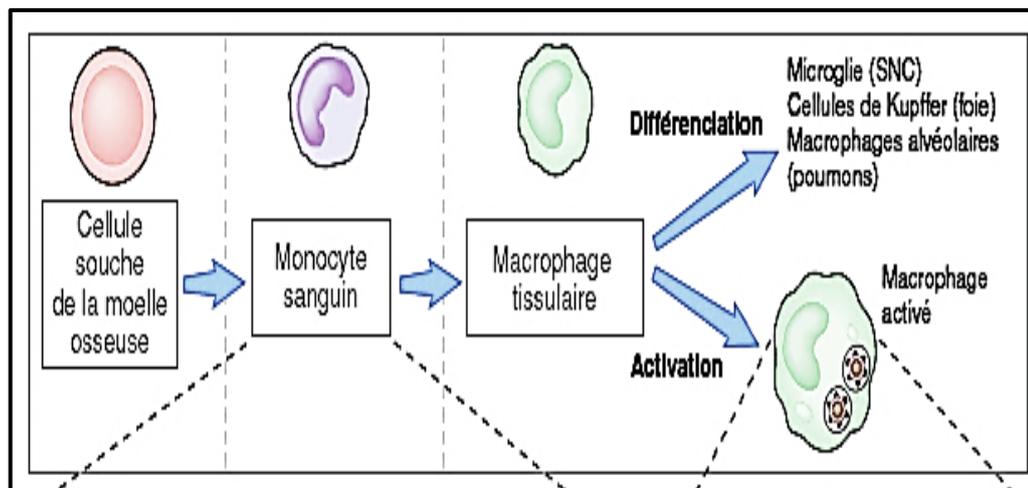
Toute perturbation des réactions de défense de l'organisme peut modifier ou aggraver le processus de cette maladie : de nombreuses pathologies générales, dont le diabète, peuvent réduire les capacités de défense de l'organisme et donc faire progresser une maladie parodontale. Il y a des périodes de stagnation et d'exacerbation qui se succèdent soit lentement (parodontite chronique) soit rapidement (parodontite agressive)<sup>[83], [84]</sup>.

## 2. Macrophage

En conséquence aux processus infectieux, causés par certains agents pathogènes responsables des pathologies bucco-dentaires ; les macrophages, aussi connus en tant que cellules leucocytaires professionnelles du système immunitaire inné, infiltrent pratiquement tous les tissus de l'organisme humain et y exercent diverses activités fonctionnelles suite à leur activation *via* certains stimuli microenvironnementaux. Ainsi, en fonction des types de stimuli perçus – molécules thérapeutiques et/ou épitopes bactériens – les macrophages peuvent être activés et polarisés selon deux états fonctionnels différents : état pro-inflammatoire et anti-inflammatoire donnant alors des macrophages classiques (M1) et alternatifs (M2), respectivement. Ceux-ci ont des profils sécrétoires cytokiniques spécifiques, des mécanismes métaboliques variés et des fonctions immunitaires adaptées assurant l'homéostasie tissulaire et la résolution de l'inflammation de par leurs actions immuno-modulatrice et immuno-régulatrice avérées<sup>[85]-[88]</sup>.

## 2.1 Définition

Les macrophages sont les phagocytes professionnels, leur nom vient du grec «makros» pour grand, et «phagein» pour manger<sup>[86]</sup> ; Ce sont des cellules de longue durée de vie, provenant de monocytes dans le sang, qui ont été produits à partir de cellules souches dans la moelle osseuse, elles expriment les cytokines pro inflammatoires et régulateurs et elles reconnaissent les LT, qui internalise et dégrade les débris et les pathogènes extracellulaires<sup>[89]</sup>, ils peuvent embraser les micro-organismes, de protéines en utilisant plusieurs mécanismes, tels que la phagocytose médiée par le complément, pinocytose et l'endocytose<sup>[86]</sup>. L'activation de ces cellules phagocytaires conduit à la production de diverses molécules telles que l'oxyde nitrique NO et les espèces réactives de l'oxygène ROS, en réponse à la phagocytose, la production de ROS et les espèces réactives de l'azote RNS ; sont respectivement sous le contrôle du nicotinamide-adénine-oxydase dinucléotide phosphate NOx, et de la synthèse inductible de l'oxyde nitrique inductible iNOS<sup>[86]</sup>.(Figure 5)



Source : (Abul K.A, Andrew H.L, 2009).

**Figure 5: Stades de maturation des phagocytes mononucléaires.**

## 2.2 Origine

Les monocytes qui pénètrent dans les tissus extravasculaires survivent dans les sites pendant des périodes prolongées ; dans les tissus, ces monocytes se différencient en cellules appelées les macrophages. Les monocytes sanguins et les macrophages tissulaires

constituent deux stades de la même lignée cellulaire, appelés des phagocytes mononucléaires<sup>[90]</sup>, proviennent de précurseurs qui se trouvent dans la moelle osseuse. Les monocytes circulants dans le sang deviennent des macrophages dans les tissus ; ils peuvent être activés par des microbes, et peuvent se différencier en formes spécialisées qui résident dans différents tissus, parmi les produits sécrétoires du Macrophage :

### **2.2.1 Métalloprotéinases**

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont des endopeptidases de matrice extracellulaire (MEC), dépendant du Zn sous forme activée, d'où leur nom générique de métalloprotéases, capables de dégrader la plupart des composants de la MEC<sup>[91], [92]</sup>.

Les métalloprotéinases seront abordées dans le sous chapitre 3 de la revue de littérature.

### **2.2.2 Cytokines**

Les cytokines sont un groupe diversifié de glycoprotéines qui agissent en tant que médiateurs intercellulaires, synthétisés par leur cellule d'origine sous l'influence de divers stimulus, elle délivrent leurs messages en réagissant des récepteurs membranaires spécifiques présents sur la surface cellulaire<sup>[93]</sup>.

Une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et agir sur un nombre important de cibles, elles peuvent améliorer ou supprimer la production d'autres cytokines <sup>[94]</sup>.

#### **2.2.2.1 Interleukine Beta -1**

Cytokine pro-inflammatoire, produite par les cellules leucocytaires, endothéliales fibroblastes, macrophages activés, présente les mêmes effets que les TNF , elle stimule l'expression des molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium , favorisant ainsi la migration des leucocytes circulants vers le site enflammé elle contribue à l'activation des cellules T<sup>[94]</sup>.

#### **2.2.2.2 Interleukine-6**

C'est une cytokine pléiotrope d'abord décrite comme un facteur de croissance des cellules T et B ; produite par les cellules T, les macrophages et les cellules endothéliales. C'est un puissant inducteur d'inflammation locale et systémique où il joue un rôle clé dans la réponse en phase aiguë en activant les phagocytes , et favorise la migration des monocytes sanguins vers les tissus et la production des protéines par les hépatocytes<sup>[94]</sup>.

### 2.2.2.3 Interleukine -10

Cytokine anti inflammatoire, régulatrice, produite par les lymphocytes T de type T Helper (Th2) et les macrophages, elle inhibe la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigène (macrophages et monocytes) et ralentit la production des différentes cytokines TNF-Alpha, IL-6, IL-1 bêta<sup>[94], [95]</sup> .

### 2.2.2.4 TNF-Alpha

Cytokine pro-inflammatoire, produite par le macrophage activé, ou cellules dendritiques en réponse à une agression microbienne en particulier en réponse au lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatif, il permet le recrutement des neutrophiles et des macrophages vers le site lésionnel en stimulant la production des molécules d'adhésion et des chimiokines, son rôle est intéressant en phase aigue inflammatoire, il active aussi la production des facteurs de croissance, indispensable à la réparation des tissus endommagés<sup>[94]</sup> .

## 2.3 Mécanisme d'activité du macrophage

### 2.3.1 Polarisation du macrophage

Les macrophages polarisants ; peuvent être classés en deux groupes principaux :

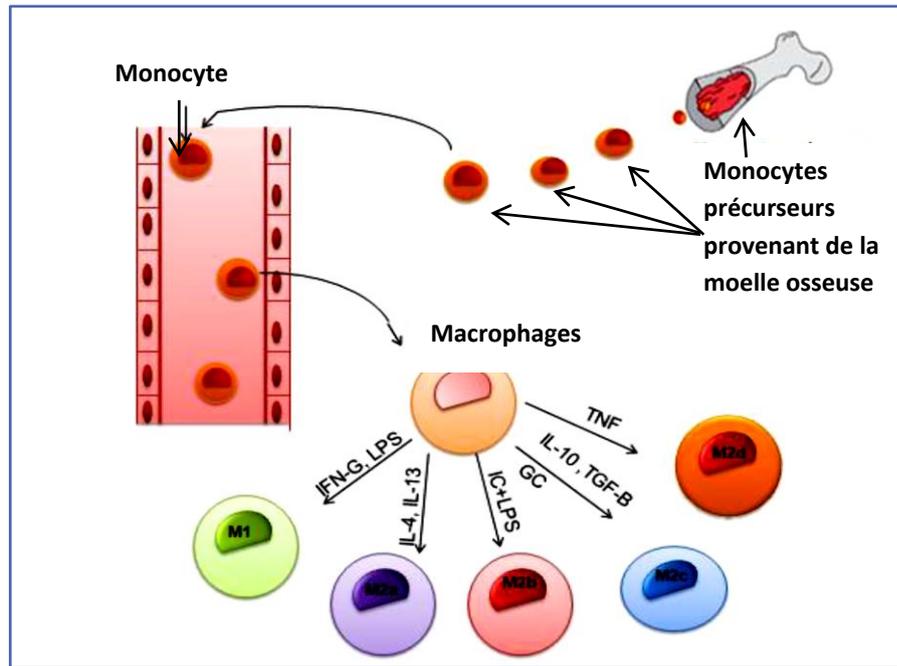
#### 2.3.1.1 Les macrophages classiquement activés ou M1

Ils sécrètent les cytokines pro-inflammatoires dont les stimuli d'activations prototypiques gamma sont IFN $\gamma$  et le LPS, présentent ainsi des propriétés microbicides puissantes <sup>[96], [97]</sup> .

#### 2.3.1.2 Les macrophages alternativement activés ou M2

Les macrophages M2 sécrètent les cytokines anti-inflammatoires, qui sont subdivisés en M2a après exposition à l'IL-4 ou IL-13, et en M2b des complexes immuns, en combinaison avec l'IL-1 bêta ou LPS; et en M2c, après exposition à IL-10, le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF)<sup>[96]</sup> .

Au-delà de l'infection, les macrophages M2 polarisés, jouent un rôle dans la résolution de l'inflammation par les capacités d'endocytose élevées, et la synthèse de facteur trophique, accompagnée par une réduction de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires<sup>[98]</sup> .  
(Polarisation du macrophage : Figure 6)



Source :Theerawut Chanmee et al. 2014.p.12

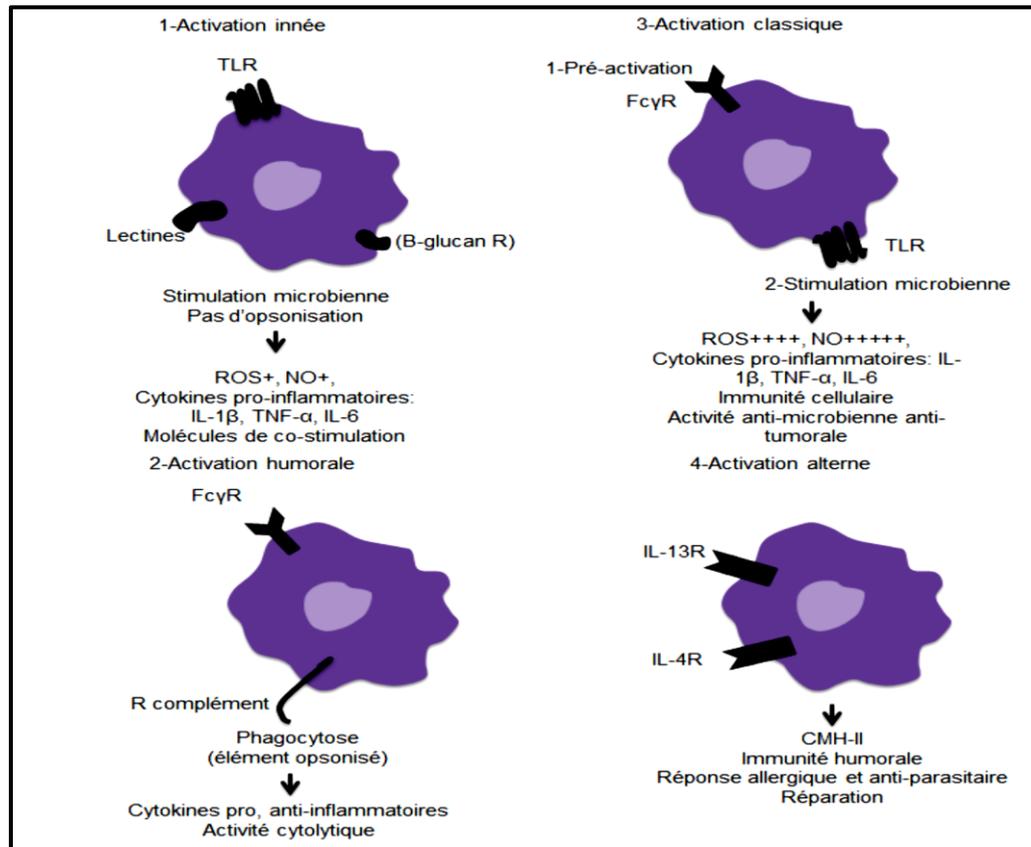
**Figure 6: Polarisation du macrophage**

### 2.3.2 Activation du macrophage

L'activation des macrophages est reconnue comme un domaine clé de l'immunologie, l'homéostasie tissulaire, pathogénèse des maladies, et dans la résolution de l'inflammation. L'activation du macrophage est induite par les récepteurs TLR ou en réponse à des facteurs de croissance tels que le CSF-1 et GM-CSF et des indices externes comme les cytokines et les glucocorticoïdes, les microbes et autres modulateurs y compris des dérivés de nucléotides<sup>[99]</sup>. Elle est aussi induite par la phagocytose, ou autres entités capables d'être reconnues par les macrophages<sup>[100]</sup>.

#### 2.3.2.1 Modes d'activation du macrophage

Il y a quatre modes d'activation du macrophage : activation innée, activation humorale, activation classique et activation alterne.



Source :  $\beta$ -glucan R,  $\beta$ -glucan receptor ; CHM-II, Complexe Major Histocompatibilité ; Fc $\gamma$ R, Fragment cristallisable receptor; IL-4R, Interleukine 4 receptor ; NO, Nitric oxide ; R complément, Récepteur de complément ; ROS, Reactives oxygen species ; TLR, Toll like receptor ; TNF, Tumor necrosis factor. (Emre Y, 2007)

**Figure 7: Les différents modes d'activation du macrophage**

L'activation innée est une activation du macrophage suite à la reconnaissance du motif moléculaire associé aux pathogènes (PAMP) par les Pattern recognition receptor (PRR).

L'activation humorale est la phagocytose facilitée par l'opsonisation.

L'activation classique est obtenue par stimulation à INF- $\gamma$  suivi d'une activation microbienne (LPS) ; Alors que l'activation alterne est régulée par les cytokines de type Th2, IL-4 et IL-13 [101].

### 2.3.2.2 Rôle du macrophage dans la résolution de la réponse inflammatoire et infectieuse

Le stress oxydatif est un état physiologique de déséquilibre entre les concentrations des espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment le monoxyde d'azote, le peroxyde d'hydrogène et les antioxydants. Cependant, une accumulation excessive du ROS entraînera les lésions cellulaires, comme les dommages à l'acide désoxyribonucléique

(ADN et aux protéines. Les ROS peuvent induire des modifications génomiques, aux protéines aussi qui affectent l'homéostasie cellulaire et peuvent entraîner une maladie<sup>[102]</sup>.

Dans des conditions physiologiques normales la production de ROS cellulaire est contrebalancée par l'action des enzymes antioxydantes cellulaires et d'autres molécules redox<sup>[103]</sup>.

### 2.3.2.2.1 Monoxyde d'azote

#### - Définition du monoxyde d'azote

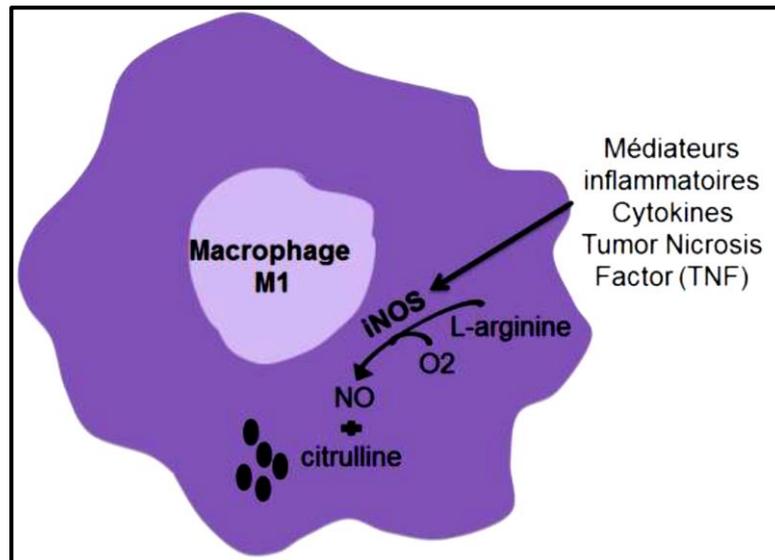
L'oxyde nitrique ou le monoxyde d'azote est radical libre relativement stable dans les conditions physiologiques, ne réagit qu'avec l'oxygène et ces dérivés, les métaux de transitions et d'autres radicaux libres. Il est synthétisé par toutes les cellules de l'organisme notamment le macrophage<sup>[104]</sup>.

Le monoxyde d'azote est produit par un enzyme : la NO synthase (NOS). Il existe trois formes de NOS : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neurale (nNOS) et la NOS inductible (iNOS). La eNOS et la nNOS sont constitutivement exprimées dans divers types cellulaires tels que l'endothélium, les neurones mais aussi les macrophages, ils sont activés en réponse au calcium. Alors que la iNOS inductible est indépendant du calcium, elle est induite suite à des stimulations par divers médiateurs inflammatoires, notamment les cytokines et les facteurs TNF. Ces enzymes produisent le NO à partir du L-arginine<sup>[104]</sup>.

Il a aussi un rôle dans l'immunité par son effet anti-bactérien et par sa contribution dans la réponse inflammatoire<sup>[105]</sup>.

#### - Voie de synthèse du monoxyde d'azote par le macrophage

La production de NO par les phagocytes tels que les macrophages se produit lors burst oxydatif, également connu comme burst respiratoire. La principale source de NO produit au cours de l'oxydation est la forme inductible de l'oxyde nitrique (iNOS, NOS2). Cette enzyme métabolise le L-arginine en utilisant l'oxygène O<sub>2</sub> en NO et citrulline<sup>[106]</sup>.



Source: *iNOS*, Inductible nitric oxide synthase ; *NO*, Nitric oxide ; *TNF*, Tumor necrosis factor.  
(Adapté de Rath M. et al ; 2014)

**Figure 8: La production du NO par le macrophage.**

#### - Effets du monoxyde d'azote

Le NO est utile dans la phase initiale de la réponse immunitaire innée, il agit comme une molécule pro-inflammatoire et peut agir comme un agent microbicide, ce qui empêche le développement d'un certain nombre des micro-organismes, y compris les virus, les bactéries, les champignons et les parasites. Les propriétés antimicrobiennes de NO peuvent être le résultat de plusieurs actions sur l'ADN, des protéines et des lipides. Outre ces propriétés anti-microbiennes, il peut aussi induire l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. D'autre part, NO est également impliqué de manière critique dans la régulation d'un certain nombre de processus biologiques divers, y compris l'immunité innée et défense de l'hôte immunologique contre les agents pathogènes envahisseurs et la cicatrisation<sup>[86]</sup>.

#### - Rôles physiologiques du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un messager cellulaire impliqué dans divers phénomènes physiologiques et pathologiques. Il joue entre autres un rôle dans le système cardiovasculaire et la relaxation de l'endothélium<sup>[107]</sup> ; En ce qui concerne le système nerveux central, le NO est un neuromédiateur qui agit par diffusion sur les neurones environnants. Le NO est également une molécule très importante dans la réponse immunitaire grâce à son action anti-microbienne et antitumorale<sup>[101]</sup>.

Lors d'une réponse inflammatoire, la NOS2 des macrophages stimulés par différentes cytokines ( $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{IL1-}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ) fournit lentement et après activation de facteurs transcriptionnels (NF-kB), de grandes quantités de NO (ordre nanomolaire)<sup>[108]</sup>, capables d'avoir une activité régulatrice paracrine sur les cellules voisines comme les cellules tueuses (NK) par exemple, ou une activité au sein même de la cellule productrice<sup>[108]</sup>. Le NO est de ce fait, considéré comme un agent pro-inflammatoire<sup>[109]</sup>.

#### - Le rôle antimicrobien du monoxyde d'azote

Le NO est un radical fortement réactif, d'où ses propriétés antimicrobiennes et anti-tumorales. Le NO peut aussi bien endommager l'ADN qu'inhiber sa synthèse. En réagissant avec différentes enzymes ou protéines, il peut altérer le bon fonctionnement des pathogènes mais également celui de la cellule. Ainsi, le revers de la médaille à son action antimicrobienne et anti-tumorale est une dégradation du tissu et un dysfonctionnement des organes en cas de production excessive ou incontrôlée<sup>[101]</sup>.

#### 2.3.2.2.2 Péroxyde d'hydrogène

##### - Définition

Le peroxyde d'hydrogène est un composé chimique de formule  $\text{H}_2\text{O}_2$ , il existe naturellement chez les êtres vivants comme sous-produit de la respiration cellulaire. Tous les organismes aérobies possèdent des enzymes, appelées peroxydases, qui catalysent la dismutation du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) et oxygène ( $\text{O}_2$ ).

##### - Rôles du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est généré en réponse à divers stimuli, y compris des cytokines et les facteurs de croissance<sup>[110]</sup>.

Bien que le peroxyde d'hydrogène soit mieux connu pour son effet cytotoxique, il est reconnu actuellement comme un régulateur important de la transduction du signal, il peut également activer les voies de signalisation visant à stimuler la prolifération, la différenciation, la migration, ou l'apoptose cellulaire<sup>[111]</sup>.

Toutefois, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le

processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' $H_2O_2$  produite au niveau du peroxydosome pourrait échapper à la catalase<sup>[110]</sup>.

Cependant, la principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires<sup>[112]</sup>. Le ROS mitochondrial joue un rôle dans divers processus cellulaires y compris, la différenciation, l'autophagie, l'adaptation métabolique, et l'activation des cellules immunitaires<sup>[113]</sup>.

### 2.3.2.2.3. Superoxyde dismutase

#### - Définition de la superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme dégradant la superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène, cette composante essentielle du mécanisme d'élimination des radicaux libres est présente chez plusieurs espèces aérobies<sup>[114]</sup>.

#### - Rôle de la superoxyde dismutase

Dans des conditions de stress et avec accumulation accrue des molécules ROS, le système de défense peut être incapable d'éliminer les activités antioxydantes, à cet égard, il va faire appel à la première ligne se trouvant dans la cellule : la superoxyde dismutase, libérée par la mitochondrie<sup>[115]</sup>.

Les SOD sont classés en quatre groupes en fonction de leur dépendance : au fer (Fe), manganèse (Mn) ou le cuivre et zinc (Cu, Zn) ou le nickel (Ni) qui se trouvent dans différents compartiments de la cellule<sup>[116]</sup>.

Cette enzyme est indispensable à de nombreux processus biochimiques, notamment la signalisation intracellulaire, la défense contre les micro-organismes et la fonction cellulaire. En revanche, une élimination importante des ROS, en particulier en superoxydase à forte dose, entraîne un stress oxydatif impliqué dans d'autres maladies.

Les ROS représentent également un composant du système immunitaire inné et signalent également la chimiotaxie des cellules inflammatoires dans les sites d'inflammation<sup>[117]</sup>,

[118].

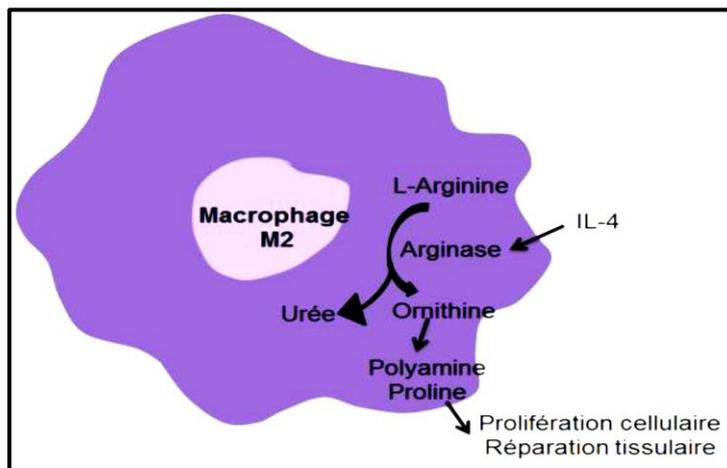
### 2.3.2.2.4 Activité de l'arginase

#### - Définition de l'arginase

L'arginase est une enzyme qui convertit l'arginine en urée et ornithine. Elle existe sous deux iso-formes distinctes : Arginase I est exprimé presque exclusivement dans le foie, où elle sert d'enzyme essentielle du cycle de l'urée et Arginase II, est une arginase mitochondriale qui se trouve dans plusieurs tissus extra-hépatiques et cellules notamment le macrophage [119].

#### - Réaction de l'arginase dans le macrophage

Lors d'une réponse immunitaire à médiation humorale, les lymphocytes B sécrètent IL-4 qui stimule l'enzyme arginase ; Cette enzyme métabolise la conversion de L-arginine en ornithine et urée, l'ornithine entre dans la synthèse de proline et de polyamine qui interviennent dans la prolifération cellulaire et la réparation des tissus<sup>[106]</sup>. (Voir figure 9).



Source : (Adapté de Meera Rath M., *et al* ; 2014).

**Figure 9: Réaction de l'arginase au sein du macrophage.**

#### - Balance arginase / iNOS

Le macrophage joue un rôle majeur dans le système immunitaire, à la fois en tant qu'une cellule effectrice et antimicrobienne et comme cellule immuno-régulatrice.

Il induit, supprime ou module les réponses immunitaires adaptatives. Ces aspects sont fondamentalement entraînés par le phénotype du métabolisme de l'arginine, très répandu dans une réponse immunitaire en cours<sup>[106]</sup>.

L'arginase et la nitric oxide synthase métabolise L-arginine dans deux voies différentes. Entre ces deux voies métaboliques, il y a des interactions d'inhibition croisées. Dans les macrophages M1, l'expression de iNOS est contrôlée par la disponibilité de l'arginine parce qu'au cours de la synthèse de NO il y a la production du NOHA qui inhibe les deux iso-formes de l'arginase. Tandis que, dans les macrophages M2, l'expression de iNOS et la production de NO est limitée par la déplétion arginine suite à sa conversion par arginase induit par IL-4<sup>[106]</sup>.

#### 2.3.2.2.5 Activité de la Catalase

##### - Définition

La catalase est une enzyme antioxydante omniprésente qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, plusieurs agents pathogènes produisent de la catalase afin de se défendre contre les attaques du peroxyde d'hydrogène, c'est une arme couramment utilisée par le système immunitaire de l'hôte, il a été en effet démontré qu'un agent pathogène mutant déficient en catalase était plus susceptible qu'un virus au stress oxydatif, induit par le peroxyde d'hydrogène et les attaques de cellules immunitaires (impliquant du peroxyde d'hydrogène).

Il est donc utile de mesurer l'activité de la catalase des agents microbiens afin de comprendre les mécanismes générés par leur pouvoir pathogène y compris leur résistance au stress oxydatif<sup>[120]</sup>.

##### - Rôles de la catalase

La catalase a deux activités enzymatiques l'élimination de l'excès de l' $H_2O_2$ , en fonction de sa concentration ; Si la concentration de  $H_2O_2$  est élevée, la catalase agit de manière catalytique, c'est-à-dire élimine  $H_2O_2$  en formant  $H_2O$  et  $O_2$  (réaction catalytique) ; Cependant, à une faible concentration en  $H_2O_2$  et en présence d'un donneur d'hydrogène approprié, par exemple l'éthanol, le méthanol, le phénol, etc... ; La catalase agit de manière peroxydée en éliminant  $H_2O_2$  mais en oxydant son substrat ( réaction peroxydasique)<sup>[121]</sup>.

#### 2.3.2.2.6 Les activités métaboliques du macrophage

##### - Le Calcium

Le macrophage utilise le calcium dans la traduction du signal apoptotique<sup>[122]</sup>.

Les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sont des seconds messagers importants qui modulent de nombreuses fonctions cellulaires et augmentent la phagocytose des macrophages et réduire l'infection bactérienne chronique.

Des recherches récentes ont démontré que le  $\text{Ca}^{2+}$  pouvait contribuer à la modulation de l'expression des gènes dans le macrophage. En utilisant des macrophages dérivés de monocytes (MDM) de patients atteints de maladie, ont montré que le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire pourrait augmenter la phagocytose et la sécrétion de cytokines associées aux sous-unités de l'IL-8, du TNF- $\alpha$  et des protéines inflammatoires des macrophages<sup>[123]</sup>.

#### - Le Glucose

Le macrophage est comme toute cellule immunitaire, a besoin des facteurs de croissances et des éléments nutritifs comme le glucose, qu'elle l'utilise pour leur activation et prolifération<sup>[124]</sup>.

#### - Le Cholestérol

Le cholestérol ( CHOL )est un constituant lipidique constant des membranes cellulaires des animaux, où il s'associe aux phospholipides et aux protéines<sup>[125]</sup>.

L'accumulation de cholestérol dans les macrophages et d'autres cellules immunitaires, favorise les réponses inflammatoires<sup>[126]</sup>, y compris l'augmentation de la signalisation du récepteur de type Toll (TLR), l'activation de l'inflammasome et la production de monocytes et de neutrophiles dans l'organisme<sup>[127]</sup>.

### 3. Métalloprotéinases

#### 3.1 Définition

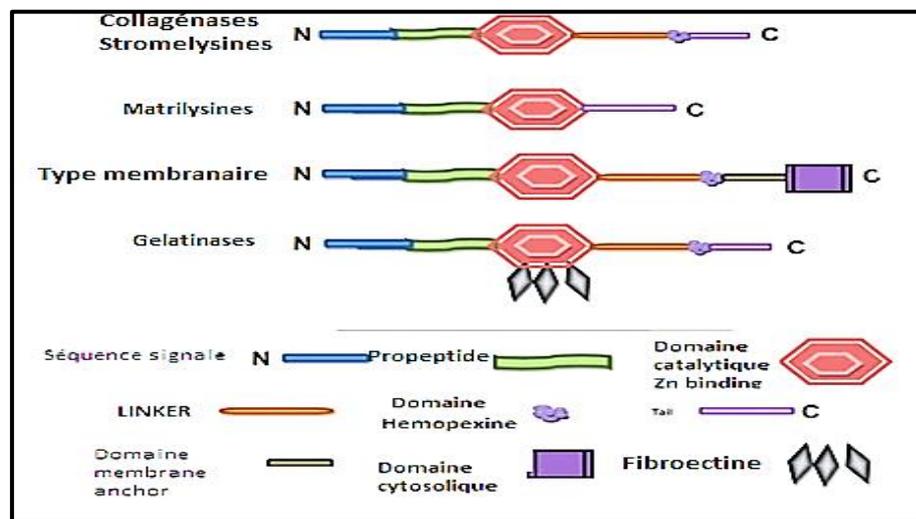
Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont des endopeptidases de matrice extracellulaire (MEC), dépendant du Zn sous forme activée, d'où leur nom générique de métalloprotéases.,capables de dégrader la plupart des composants de la MEC<sup>[91], [92]</sup>.

Leur activation est responsable de l'induction de chimiotactisme et de migration cellulaire, d'apoptose et d'inflammation. Les MMPs jouent un rôle fondamental au cours de l'embryogenèse, du remodelage des tissus normaux, des mécanismes de cicatrisation et de l'angiogenèse. Cependant, une sur expression de plusieurs MMPs est impliquée dans l'invasion tumorale<sup>[128]</sup> et les processus physiologiques et pathologiques. Un

déséquilibre entre la concentration des MMPs et leur inhibiteurs provoquent des perturbations tissulaires<sup>[43], [129]</sup>.

### 3.1.1 Structure

Les MMPs ont une structure composée de trois domaines en commun (Figure10) : Le prédomaine, qui sert à leur transport intracellulaire vers le milieu extra cellulaire, le prodomaine qui maintient la MMP sous forme inactive par une séquence peptidique, comprenant un résidu cystéine qui interagit comme quatrième ligand de l'ion Zn, et le domaine catalytique proprement dit<sup>[43],[92]</sup>. Les structures en domaine de tous les métalloprotéinases sont rapportées dans la Figure 10.



Source : M. Maciejczyk, et coll « The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases », Adv Clin Exp Med, vol. 25, n° 2, 2016. p 384

**Figure 10 : Organisation des domaines des différents types de MMPs**

### 3.2 Origine

La famille des MMP est répartie en deux groupes, en fonction de leur localisation cellulaire (secrétée ou liée à la membrane), ou en six groupes classés en fonction de leurs caractéristiques : spécificité du substrat<sup>[130]</sup>.

On compte actuellement 24 MMP réparties en 6 sous-familles, la première sous-famille comprend les 4 collagénases interstitielles, la seconde les 2 gélatinases, la troisième les 3 stromélysines, la quatrième les 2 matrilysines, la cinquième les 6 MMP de type membranaire et la sixième les 7 MMP qui forment un groupe hétérogène<sup>[92], [131]</sup> ( voir tableau III ci-dessous).

Tableau III : Classification of MMPs.

<b>METALLOPROTEINASES</b>	
<b>Collagénases</b>	MMP-1 (collagenase-1, collagénase interstitielle) MMP-8 (collagenase-2, collagénase neutrophile)
<b>Gélatinases</b>	MMP-13 (collagenase-3) MMP-2 (gélatinase A, 72-kDa gélatinase) MMP-9 (gélatinase B, 92-kDa gélatinase)
<b>Stromelysines</b>	MMP-3 (stromelysin-1) MMP-10 (stromelysin-2) MMP-11 (stromelysin-3) MMP-12 (métalloelastase)
<b>Matrilysins</b>	MMP-7 (matrilysin, PUMP-1) MMP-26 (matrilysin-2)
<b>MT-MMPs (Membrane type)</b>	MMP-14 (MT1-MMP) MMP-15 (MT2-MMP) MMP-16 (MT3-MMP) MMP-17 (MT4-MMP) MMP-24 (MT5-MMP) MMP-25 (MT6-MMP)
<b>Autres MMPs</b>	MMP-18 MMP-19 MMP-20 (enamelysin) MMP-21 MMP-23 MMP-27 MMP-28 (epilysin)

Source : (Maciejczyk et al. 2016b). p 385

### 3.1.2.1 Métalloprotéinases-13 (Collagénases-3)

Les collagénases interstitielles forment un second groupe de MMP qui interviennent dans la dégradation du collagène fibrillaire, incluant les collagènes de type I, II, III et VII. Le clivage protéolytique du collagène fibrillaire par ces enzymes entraîne la formation de collagène dénaturé (gélatine) qui peut ensuite être dégradé par les gélatinases. La MMP-13 (collagénase-3) est caractérisée par un spectre enzymatique plus large et est essentiellement exprimée dans des zones nécessitant un remaniement rapide de la matrice extracellulaire telles que le tissu osseux foetal en développement ou les sites d'inflammation chronique<sup>[132], [133]</sup>.

### 3.1.2.2 Métalloprotéinase-9 (GélatinasesB)

Les gélatinases (MMP-9) forment la quatrième classe de MMP dont l'activité protéolytique est dirigée contre le collagène interstitiel dénaturé (gélatine) et les collagènes de type IV et V de la membrane basale. Une caractéristique structurelle de ces

gélatinases est la présence, au sein du domaine catalytique, de trois séquences peptidiques répétitives analogues aux motifs de la fibronectine de type II. Ces dernières permettent la liaison à la gélatine. L'expression de la MMP-9 (gélatinase-B) est faible ou absente dans les tissus normaux et limitée aux monocytes et aux macrophages<sup>[131]</sup>.

### 3.3 Mécanisme d'action des métalloprotéinases dans les infections dentaires

Ces enzymes protéolytiques ont été identifiées à plusieurs niveaux tissulaires, en effet, les odontoblastes, outre que ses composants constitutifs secrètent des MMP, la gélatinase A (MMP-2), la gélatinase B (MMP-9), la collagénase 2 (MMP-8), la collagénase-3 (MMP-13), l'énamélysine (MMP-20) et la métalloprotéinase matricielle de type membranaire. 1 (MT1-MMP)<sup>[134]</sup>, leurs rôles essentiels sont : la formation physiologique de la dentine secondaire et la minéralisation des dents, dégradation de la matrice lors de lésions dentaires, dans la dentinogénèse tertiaire et le rôle dans l'inflammation de la pulpe [43], [44].

Ces MMPs sont localisés dans la dentine<sup>[12], [135], [136]</sup>, mais préférentiellement au niveau de la zone de pré-dentine et la jonction émail- dentine., appelées « MMP endogènes »<sup>[135]-[138]</sup>.

De même, il peut s'agir des MMP dérivées des fluides buccaux : de la salive, du fluide gingival crévulaire, on retrouve des MMP salivaires de type collagénases (MMP-1, MMP-8) des gélatinases (MMP-2, MMP-9)<sup>[12]</sup>.

De plus, il a été prouvé que les MMPs sont secrétées par des bactéries, dans plusieurs conditions pathologiques, notamment celles responsables de la lésion carieuse et la maladie parodontale <sup>[12], [138], [139]</sup>.

Ce pool enzymatique, se trouve en phase latente et nécessite une activation pour la dégradation de la matrice tissulaire dans des conditions pathologiques ; nous citons par la suite les différents rôles des MMPs dans les différents processus pathologiques dentaires.

#### 3.3.1 Rôle dans le processus carieux

La déminéralisation est provoquée par des acides bactériens, les protéases piégées dans la masse dentinaire et celles produites par les bactéries. Ils sembleraient être responsables de la dégradation de la matrice collagénique, très sensible au milieu acide et incapable de

résister à la chute de pH au dessous 4,3. De plus, les protéines phosphorylées libérées par les acides bactériens, lors de la formation du collagène interagissent avec les MMPs au sein de la lésion carieuse, en activant ainsi le processus de dégradation<sup>[131]</sup>.

La présence accrue de MMPs ,le long de la jonction dentine-émail, peut contribuer à l'évolution des lésions carieuses le long de cette jonction, au fur et à mesure de son évolution vers dentine, il a été constaté que l'activité des MMPs diminuait avec l'âge dans les lésions carieuses actives et chroniques <sup>[41], [131]</sup>.

### 3.3.2 Rôle dans l'inflammation pulpaire

La progression des lésions carieuses entraîne une inflammation de la pulpe, provoquant ainsi une agrégation de cellules inflammatoires qui, à leur tour, libèrent des cytokines inflammatoires. Les MMPs ont un double rôle dans la pathogenèse de l'inflammation, stimulant ainsi les fonctions immunitaires protectrices innées et / ou adaptatives, ainsi que la destruction des tissus<sup>[41], [131], [137]</sup>.

Dans la réaction pulpaire, des composés bactériens et des facteurs inflammatoires peuvent stimuler la dégranulation et la sécrétion de neutrophiles par les monocytes/macrophages. La libération d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  est capable d'induire la MMP-1, la MMP-2 ,MMP-13 dans les cellules pulpaires <sup>[41]</sup>.

La stimulation par les bactéries augmente la production de MMP-2 et les toxines des bactéries anaérobies provoquent l'excrétion des cellules pulpaires par la MMP-1 et la MMP-22. Des taux significativement plus élevés de MMP-1, -2 et -3 ont été trouvés dans les pulpites aiguës par rapport au tissu pulpaire normal <sup>[44], [134], [141]</sup>.

Les bactéries et leurs produits de sécrétion agissent dans l'inflammation pulpaire en régulant positivement la production de cytokines, en augmentant l'expression des MMP-9 et en stimulant directement les cellules pour produire des MMPs<sup>[142]</sup>.

### 3.3.3 Rôle dans l'inflammation parodontale

Au stade de l'inflammation parodontale, les fibroblastes, les macrophages et les PMN vont libérer des enzymes, médiateurs de la résorption osseuse : les MMPs, notamment des collagénases et des gélatinases, impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire au cours de processus physiologiques et pathologiques.

Ces enzymes jouent un rôle clé dans la dégradation de différentes molécules extracellulaires comme le collagène et l'élastine, mais elles peuvent aussi activer des cytokines et des chémokines modulant ainsi la réponse de l'hôte. Elles sont considérées aujourd'hui comme des médiateurs clés de la destruction parodontale, impliquées dans la destruction des tissus parodontaux<sup>[143]</sup>.

Les LPS d'*Actinobacillus Actinomycetemcomitans* induisent la sécrétion de MMP-1, 9 et, à moins grande échelle, de MMP-3, 7, 8 et 13 par les macrophages, plus spécifiquement la MMP-3, qui dégrade les composants des membranes basales mais elle active aussi MMP-1, 8 et 9. La MMP-9 est une gélatinase capable de digérer le collagène de type V, composant majeur des membranes basales, à son tour, la MMP-13 est une collagénase pouvant activer MMP-9<sup>[144], [145]</sup>.

D'autre part, des taux deux fois plus élevés de MMP-9 dans le fluide gingival ont été rapportés sur des patients présentant des pertes d'attache progressives<sup>[146]</sup>.

Des auteurs ont montré que les MMP-9 pouvaient recruter des ostéoclastes puis induire leur différenciation et donc la résorption osseuse. La MMP-13 sécrétée par les cellules ostéoblastiques proches des ostéoclastes dans les sites de résorption osseuse, par les fibroblastes gingivaux, les macrophages et les plasmocytes, appelée aussi collagénase et toujours observée à un taux élevé dans les tissus gingivaux et le fluide gingival des sujets atteints de maladie parodontale. Dans des sites actifs de parodontite agressive.

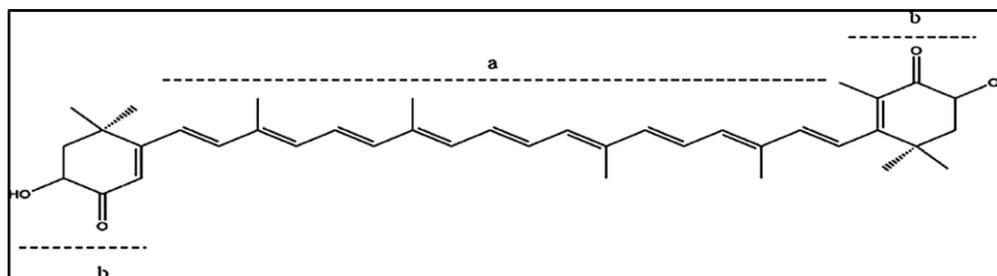
Les auteurs concluent que les MMP-13 représentent un marqueur de la progression de la maladie et de la perte osseuse, pouvant aussi activer les MMP-9 en cascade<sup>[143]</sup>.

## 4. L'Astaxanthine

### 4.1 Définition

L'astaxanthine est un cétoparoténoïde qui appartient au groupe des caroténoïdes appelés xanthophylles (AST), 3,3'-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -carotène-4,40-dione<sup>[144,145]</sup>. Il possède une structure étendue avec deux extrémités polaires avec des cycles ionones moléculaires qui lui permettent de posséder une capacité de neutralisation des radicaux libres, une zone non polaire au milieu, qui se compose d'une série de doubles liaisons carbone-carbone dite "conjuguée". La possession de 13 doubles liaisons conjuguées polyinsaturées, donne à l'AST ses propriétés chimiques uniques, sa structure moléculaire et son absorption de

la lumière caractéristique. L'hydroxyle en position 3,3' $\beta$  et les fractions de céto sur chaque cycle d'ionone rendent la molécule AST plus polaire et améliore considérablement sa fonction membranaire (Figure. 11)<sup>[146]</sup>.



Source : S. Fakhri et coll, F Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits, Pharmacol. Res., vol. 136, p.3, août 2018

**Figure 11: Structure chimique de l'AST**

## 4.2 Origine

C'est un pigment végétal accessoire d'origine marine<sup>[150]</sup>, isolé pour la première fois en 1938 à partir du homard par Kuhn et al., de couleur rouge-orange commun à de nombreux crustacés tels que les salmonidés, les crevettes et les écrevisses, qui représentent aussi d'autres sources de la molécule<sup>[147], [149]</sup>.

Ce métabolite est naturellement synthétisé par des plantes, quelques champignons (*Chlorococcum sp*, *Chlorella zofingiensis*), une bactérie marine (*Agrobacterium aurantiacum*), des levures (spécialement dans la levure *Xanthophyllomyces dendrorhous*), des microalgues mais *l'Haematococcus pluvialis* semble être la source la plus prometteuse pour sa production biologique industrielle ; elle accumule de très fortes concentrations d'AST dans des conditions stressantes telles que la salinité élevée, la carence en azote, les températures élevées et la lumière ; de ce fait, elle est utilisée en produits pharmaceutiques, cosmétiques et aquacultures<sup>[147], [148], [151]</sup>.

L'AST se présente sous trois formes (libre, monoester et diester) et elle est commercialisée sous forme d'oléorésine obtenue<sup>[152]</sup> par plusieurs méthodes d'extraction assistées par micro-ondes et des méthodes enzymatiques<sup>[148], [153]</sup> ; c'est un composé lipophile qui peut être dissous dans les solvants et les huiles. L'astaxanthine provenant de *l'Haematococcus* est extraite par différents traitements : à partir de l'acide chlorhydrique<sup>[154]-[156]</sup>.

Dans d'autres études, les huiles végétales telles que l'huile de soja, maïs, olive et pépins de raisin ont été exploitées pour extraire l'astaxanthine de *Haematococcus*. Le rendement en astaxanthine d'*Haematococcus* était de 80% à 90% en utilisant lors de l'extraction l'éthanol et de l'huile de tournesol comme co-solvant [148], [154], [156], [157].

L'astaxanthine dérivée d'*Haematococcus* était stable à 70-90°C dans les huiles de ricebran, de gingembre et de palme, pendant neuf semaines [158].

La stabilité de l'astaxanthine de *Phaffia rhodozyma* était élevée à pH 4,0 et à une température inférieure [159]. La stabilité au stockage de l'astaxanthine a été améliorée à 4°C et 25 °C dans un mélange complexe d'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine et d'eau [160].

### 4.3 Mode d'action

#### 4.3.1 Effets antioxydants

Le stress oxydatif peut être induit par un déséquilibre entre cellules de défense antioxydante et la charge en oxydant résultant d'un apport alimentaire inadéquat ou de l'inflammation ou de l'infection, pouvant endommager le fonctionnement mitochondrial impliquant des perturbations métaboliques remarquables ( maintien de l'état Redox cellulaire , régulation , apoptose) [103].

L'excès de molécules oxydantes peut réagir avec les protéines, les lipides et l'ADN, pour provoquer l'oxydation des protéines et des lipides et endommager l'ADN, et peut être inhibé par les antioxydants endogènes et exogènes tels que les caroténoïdes, qui libèrent l'oxygène en piégeant les radicaux, l'astaxanthine avait une activité antioxydante plus élevée que divers caroténoïdes [161]. Les enzymes antioxydantes telles que la catalase, superoxyde dismutase, peroxydase étaient élevées dans le plasma et le foie de rats après avoir une supplémentation d'astaxanthine [155].

Plusieurs travaux ont montré le pouvoir antioxydant de l'astaxanthine [103], [149], [152], [155], [160]-[163]. Sur la base de sa forte activité antioxydante, les effets bénéfiques de l'AST en supplémentation ont été évalué pour un grand nombre de problème de santé, problèmes cutanés, neurologiques et semble avoir un rôle protecteur contre la détérioration par le piégeage des radicaux libres [147], [164].

### 4.3.2 Effets anti inflammatoires

L'inflammation est une séquence de réponses immunitaires complexes, qui se produit en tant que mécanisme de défense de l'hôte ou en réaction à un traumatisme afin d'initier le processus de réparation tissulaire. Cependant, excessive ou incontrôlée l'inflammation est néfaste à l'hôte et peut engendrer des dommages cellulaires et tissulaires<sup>[165]</sup>, l'AST est un puissant anti-oxydant qui prévient l'apparition de l'inflammation par plusieurs mécanismes<sup>[149],[166]</sup>. A cet effet, les effets anti-inflammatoires de l'AST jouent un rôle important dans la prévention de la progression des troubles du système nerveux central, en bloquant le NF- $\kappa$ B-dépendant de la voie de signalisation; ils empêchent également l'expression du gène des médiateurs inflammatoires tels que l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'IL-6) et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>[149]</sup>. L'AST présente également des propriétés anti-inflammatoires en inhibant l'enzyme cyclooxygénase-1 (COX-1) et l'acide nitrique oxyde (NO) dans les cellules microgliales stimulées par des lipopolysaccharides [167], [168].

### 4.3.3 Effets anti tumoraux

Les oxydants contribuent au vieillissement et au développement des maladies dégénératives comme le cancer et l'athérosclérose<sup>[149],[150],[155],[169]</sup>, alors que les antioxydants diminuent la mutagénèse et la cancérogénèse en inhibant les effets oxydatifs au niveau des cellules. La communication intercellulaire se fait par l'intermédiaire des jonctions entre les interstices et fait défaut dans les tumeurs humaines. Les caroténoïdes ont amélioré la communication entre les cellules<sup>[149], [170]</sup>.

L'astaxanthine a montré une activité antitumorale significative par inhibition de la croissance des fibrosarcomes, des cellules cancéreuses du sein et de la prostate, du colon en inhibant la fonction de la 5- $\alpha$ -réductase et des fibroblastes embryonnaires<sup>[150], [171], [172]</sup> en arrêtant la progression du cycle cellulaire<sup>[149], [170], [173], [174]</sup>.

### 4.3.4 Activité anti-apoptotique de l'AST

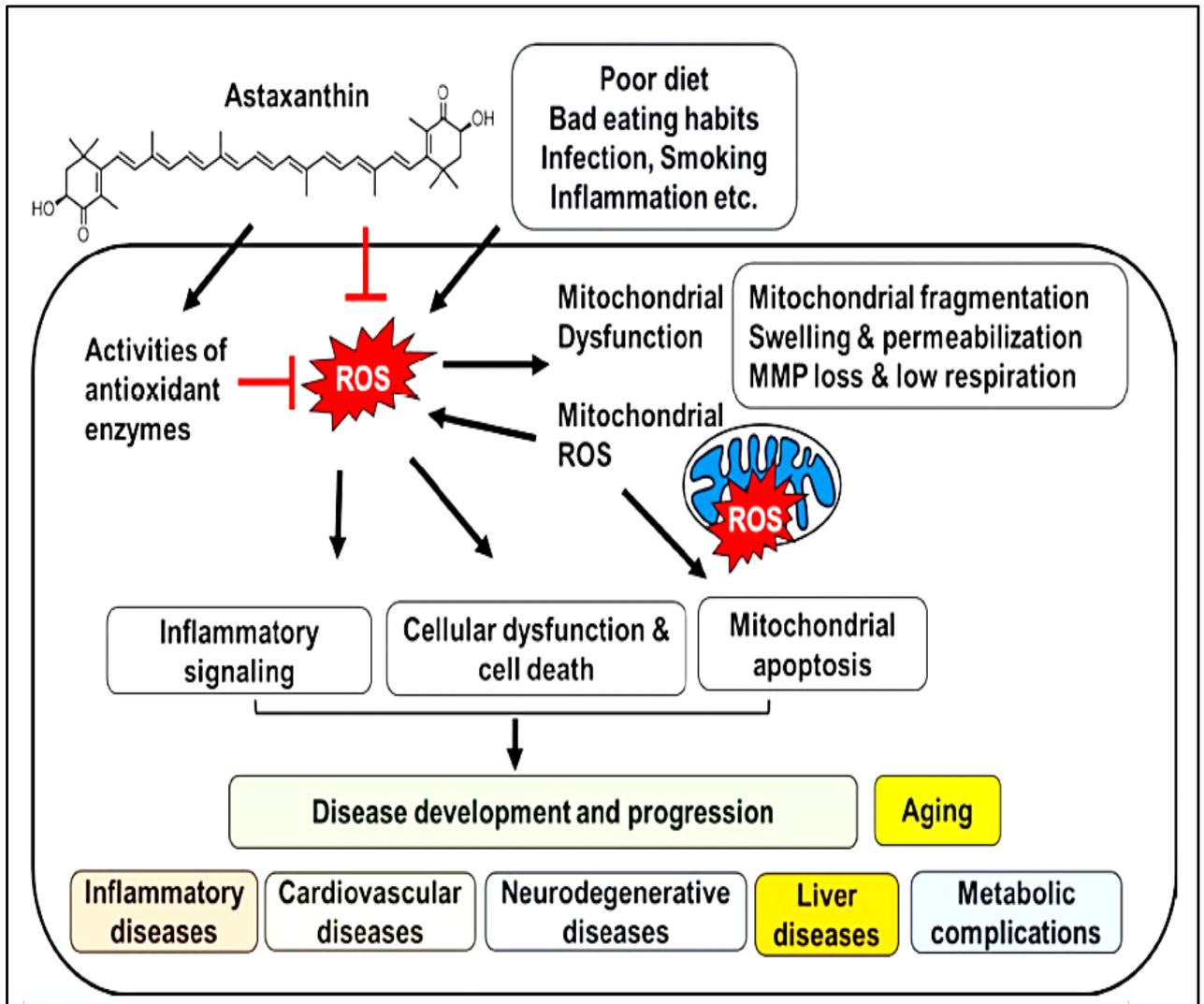
L'apoptose est un programme de mort cellulaire bien orchestré pour l'homéostasie des tissus normaux et pour l'élimination des cellules endommagées, anciennes ou infectées, régulée par deux voies : la voie intrinsèque répond à des dommages à l'ADN, et la voie extrinsèque activée par des signaux de mort induits, une infection activant le système immunitaire. Cependant, ce programme est souvent perturbé dans les

hémopathies malignes conduisant à l'accumulation de cellules malignes<sup>[175]</sup> ou au dysfonctionnement de multiples organes dans des maladies neuro-dégénératives. Diverses options thérapeutiques existent pour le contrôle de l'apoptose<sup>[155], [176]</sup>. L'AST peut exercer un rôle soit anti-apoptotique, soit pro-apoptotique et ce, en fonction de l'état pathologique.

#### 4.3.5 Activité immunomodulatrice de l'AST

L'AST présente des effets immunomodulateurs en améliorant la production d'anticorps et la réduction de la réponse immunitaire humorale après une supplémentation alimentaire d'AST<sup>[177]</sup>. Il a été démontré que la molécule augmente l'activité immunomodulatrice de l'organisme par la production d'INF- $\gamma$  et d'IL-2<sup>[149], [155]</sup>. D'autres études *in vitro* ont montré que l'AST pourrait augmenter le taux de production d'anticorps, des lymphocytes T auxiliaires, d'immunoglobulines M (IgM), IgG et IgA<sup>[146,175,176]</sup>. En réponse au stress, l'AST prévient les altérations des fonctions immunologiques en augmentant la réponse immunitaire par l'intermédiaire des cellules tueuses naturelles (NK) et des lymphocytes T, en aussi réduisant le taux de la protéine c-réactive (CRP)<sup>[145,146,174,176-178]</sup>.

Les différents rôles de l'astaxanthine sont résumés dans la Figure 12.



Source : S. H. Kim et H. Kim, « Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review », *Nutrients*, vol. 10, n° 9, 2018 p 5.

**Figure 12: Le mécanisme proposé par lequel l'astaxanthine inhibe le dysfonctionnement mitochondrial induit par le stress oxydatif et le développement et la progression des maladies.**

## 5. Problématique

La maladie carieuse est définie comme étant un processus pathologique localisé, d'origine externe, apparaissant après l'éruption dentaire, qui s'accompagne par une atteinte de l'émail, suivi d'un ramollissement de la masse dentinaire, composée essentiellement de collagène type I et II et des pro-enzymes tel que les MMPs dans un état latent.

La lésion est due à l'action combinée de plusieurs facteurs à savoir le biofilm bactérien, le terrain de prédisposition et l'acidité élevée qui cause l'activation des MMPs existants dans la dentine, ou dans la salive en plus de sa production par les macrophages pro-inflammatoires. Fait important, le rôle des bactéries dans la stimulation du système immunitaire, aussi bien inné qu'adaptatif, est bien élucidé et a fait l'objet de recherches très intenses.

Par ailleurs le système immunitaire lutte contre la lésion carieuse, d'une part par les barrières de défense de l'immunité innée telles que la salive et les tissus durs de la dent et d'autre part, par le déclenchement d'un profil inflammatoire par les macrophages M1 classiquement activés et par conséquence par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

De plus, la maladie parodontale résulte d'un déséquilibre entre l'hôte et le système bactérien, libérant une série d'enzymes collagénases et protéases, suite à la dégradation du collagène et déclenche une cascade de réactions inflammatoires, en stimulant les productions des cytokines.

En effet, ces enzymes présentes aussi bien dans la maladie carieuse et parodontale, se trouvent sous forme de précurseurs inactifs et requièrent une activation pour dégrader les composants matriciels exposés.

Plusieurs travaux utilisant des produits naturels ou synthétiques ont été suggérés pour inhiber le mécanisme d'activation des MMPs notamment l'aloë vera, la chlorhexidine, l'indométacine, les extraits de grains de raisins ainsi que l'astaxanthine. Cette molécule thérapeutique a d'ailleurs été longtemps reconnue pour ses propriétés immunomodulatrices notamment dans le cas des récepteurs activés par les proliférateurs des péroxysomes<sup>[182]</sup>.

Dans cette optique, nous avons réalisé des essais thérapeutiques *ex vivo* sur des macrophages humains provenant de sujets atteints d'infections carieuses et parodontales comparés aux sujets sains. Ceci afin d'étudier l'effet immuno-modulateur possible de l'astaxanthine sur la

production des MMP-9 et 13 par les macrophages induits par les produits inflammatoires qui font suite au processus infectieux dentaire.

Par la suite, nous avons étudié la prévalence des deux maladies chez des enfants ayant une denture permanente complète âgés entre 12 à 15 ans.

# **Chapitre 2**

## **Matériels et Méthodes**

## Chapitre 2 : MATERIELS ET METHODES

### 1. Type de l'étude

Il s'agit d'une étude Hybride englobant :

- Un essai thérapeutique *in vitro* de l'astaxanthine sur l'inhibition de l'action des métalloprotéinases impliquées dans la carie dentaire et la maladie parodontale.
- Une enquête observationnelle transversale descriptive à visée analytique des enfants âgés entre 12 ans à 15 ans de l'année scolaire 2015- 2016.

### 2. Objectifs

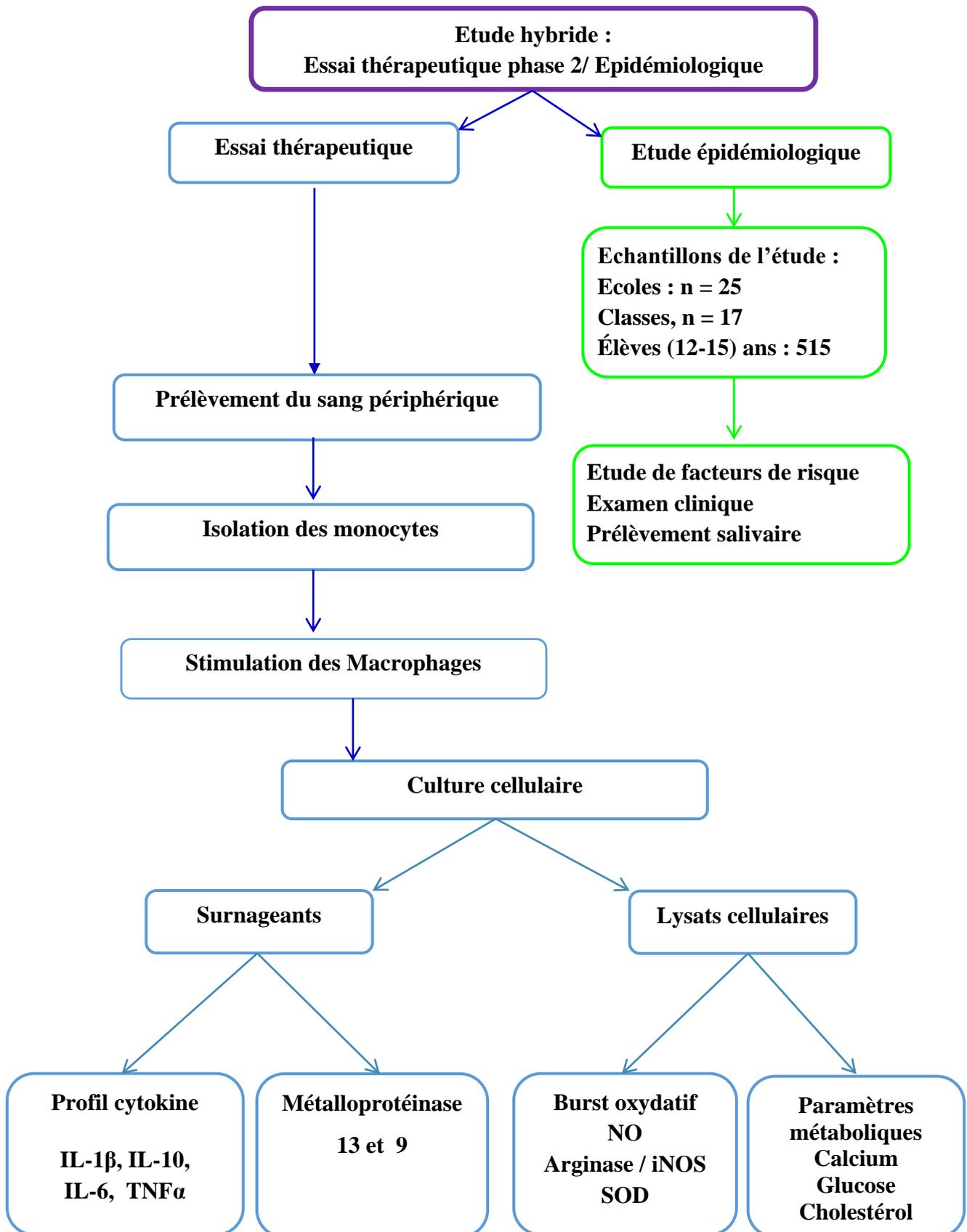
#### 2.1 Principal

Evaluer le pouvoir inhibiteur de l'astaxanthine sur la sécrétion des MMP-9 et MMP-13 par le macrophage humain, chez les enfants ayant une maladie carieuse et une maladie parodontale.

#### 2.2 Secondaires

- Décrire le profil épidémiologique des maladies bucco-dentaires chez les enfants âgés entre 12 ans et 15 ans et calcul de la prévalence des deux maladies (l'étude portera sur les dents permanentes).
- Etudier l'effet de l'astaxanthine sur les activités fonctionnelles et métaboliques du macrophage, le burst oxydatif, la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires ainsi que l'activité de l'arginase et la NO syntase.

### 3. Conception de l'étude



## **4. Définition de la maladie**

### **4.1 Maladie carieuse**

Cliniquement, la maladie carieuse se définit par la présence d'une cavitation visible à l'œil nu intéressant les structures amélo dentinaires et qui volumétriquement occupe au minimum le tiers moyen jusqu'au tiers supérieur dentinaire.

Elle peut être diagnostiquée au moyen d'un miroir et une sonde sous un éclairage suffisant.

### **4.2 Maladie parodontale**

La maladie parodontale se manifeste cliniquement par une augmentation de volume de la gencive, elle se diagnostique au moyen d'une sonde graduée ; sera considérée comme poche, toute infractuosit , égale ou sup à 2mm.

## **5. Population de l'étude**

### **5.1 Critères d'inclusion**

La présente étude a été menée sur les enfants âgés de 12 à 15 ans, scolarisés au niveau des établissements d'enseignement moyen et secondaire de la commune de Tlemcen durant l'année 2015-2016. Cette tranche d'âge a été choisie en raison de la présence de toutes les dents définitives, nous permettant ainsi le calcul de l'indice CAO.

### **5.2 Critères de non inclusion**

Tous les enfants de moins de 12 ans et plus de 15 ans, ceux atteints de troubles de métabolisme et désordres physiologiques tels que le diabète, le cancer, le syndrome sec, les cardiopathies, l'épilepsie, l'insuffisance rénale, le rhumatisme articulaire aigu, ceux sous traitement antibiotique et anti inflammatoire, la chimiothérapie, la radiothérapie, les antihistaminiques ou les psychotropes n'ont pas été recrutés en plus de ceux portants les appareillages orthodontiques fixes.

## **6. Déroulement de l'étude**

### **6.1 Etude descriptive**

Il s'agit d'une enq tre observationnelle transversale à visée analytique, en milieu scolaire allant de la période d'octobre 2015 jusqu'au mois d'avril 2016.

### 6.1.1 Cadre de la population

La wilaya de Tlemcen se situe à l'extrémité nord-ouest du pays et occupe l'Oranie occidentale, elle s'étend du littoral au Nord à la steppe au Sud. Elle est délimitée : au Nord, par la Méditerranée ; à l'Ouest, par le royaume du Maroc ; au Sud, par la wilaya de Naâma et à l'Est, par les wilayas de Sidi-Bel-Abbès et Ain Témouchent.

La population de la wilaya est estimée à 1 059 004 habitants, pour une densité de 113 habitants /km<sup>2</sup>, (Direction des actions sanitaires spécifiques. Programme national de santé bucco-dentaire en milieu scolaire. Tlemcen, Décembre 2016) concentrée essentiellement au Nord. Dans sa partie Sud, la densité de population compte un ratio de 9 habitants /km<sup>2</sup>, soit un taux de 33% du total d'habitants de toute la wilaya.

L'établissement public de santé de proximité de Tlemcen situé au chef-lieu de Wilaya englobe quatre daïras avec une population de 439736 habitants répartis sur une superficie de 1 124,84 Km<sup>2</sup> et 10 communes avec 07 Unités de Dépistage et de Suivi.

Le total des habitants ayant la tranche d'âge entre 12 à 15 ans est de 91788 enfants répartis dans les quatre communes (Direction des actions sanitaires spécifiques. Programme national de santé bucco-dentaire en milieu scolaire. Tlemcen, Décembre 2016).

### 6.1.2 Taille d'échantillon

La taille est calculée en prenant une prévalence de 68%, à partir d'une étude prise comme référence menée à la commune d'Arzew<sup>[34]</sup> en milieu scolaire chez des adolescents âgés de 12 à 15 ans, pour une précision de 0,02, avec un risque  $\alpha = 5\%$ , ce qui nous donne un nombre de sujets suffisant et nécessaires de 439.

En prévision des "abandons et perdus de vue", *Nous avons opté pour un échantillon de 515 enfants.*

### 6.1.3 Déroulement de l'étude

Après avoir obtenu les autorisations de la direction de la santé et de l'éducation nationale (voir annexe A), un contact a été réalisé avec la direction de la prévention de l'établissement public de santé et proximité de Tlemcen pour obtenir la liste des Unités de Dépistage et de Suivi et les écoles rattachés à ces derniers.

Un tirage au sort stratifié a été effectué en fonction des niveaux des classes des élèves. Après un calcul de la fraction d'échantillonnage pour chaque niveau scolaire, le nombre d'élèves par strate était comme suit : 95 élèves en premier cycle secondaire soit l'équivalent de trois classes, 120 élèves en 1<sup>ère</sup> année moyenne (04 classes) ,130 élèves en 2<sup>ème</sup> année moyenne (04 classes), 65 élèves en 3<sup>ème</sup> année moyenne (02 classes), 105 élèves 4<sup>ème</sup> année moyenne (04 classes).

Toutes les classes par niveau ont été introduites dans le Logiciel Excel Microsoft, les trois premières classes figurant dans la liste après utilisation de la fonction ALEA ont été sélectionnées dans l'échantillon, ensuite l'identification des élèves a été faite au niveau des UDS en fonction du programme établi par ces derniers.

Un consentement éclairé a été distribué aux élèves appartenant aux classes tirées au sort par le coordinateur de la santé scolaire avant le programme de leur visite médicale (voir annexe B).

#### **6.1.4 Recrutement des patients**

Cinq cent quinze (515) jeunes patients éligibles ont été recrutés au sein des Unités de Dépistage et de Suivi de l'EPSP de Tlemcen, une équipe de trois étudiants a participé dans cette étude pour la collecte des données à partir d'un questionnaire détaillé (voir annexe C).

Ce questionnaire comprend :

- Une partie de renseignements socio démographiques, (le niveau socio économique a été évalué selon l'indice de position socioéconomique (IPSE). (Voir annexe D).
- Des antécédents médico dentaires.
- Un examen des paramètres physico chimiques de la salive : pH, débit et viscosité.
- Une histoire de la maladie carieuse avec l'appréciation de l'indice CAO, les renseignements sur les mesures d'hygiène et la fréquence de brossage.

Les participants se sont présentés de 8h-11h du matin, avec un formulaire de consentement éclairé signé par leur tuteur, tous les enfants ont été informé d'un jeûne d'au moins d'une heure ; il a été recommandé de ne rien manger, ni boire ni mâcher ou même de se brosser les dents pendant une heure au minimum avant la consultation <sup>[183],[184]</sup>.

L'examen dentaire a été effectué au moyen d'un plateau de consultation contenant un miroir et une sonde de Rheins N° 17 pour vérifier la présence de la lésion carieuse, appréciée cliniquement par une présence d'une cavité qui "accroche" au passage de la sonde.

L'état dentaire a été évalué par l'indice CAO de Palmer et Klein pour la denture permanente<sup>[12]</sup>. C'est la somme de trois paramètres(C+A+O) par rapport au nombre de sujets examinés.

- **C** : Concerne le nombre de toutes les dents cariées.
- **A** : Concerne le nombre de toutes les dents absentes ou extraites,
- **O** : Concerne le nombre de toutes les dents restaurées à l'amalgame ou au composite.

L'échelle de comparaison de l'Indice CAO était classée en cinq niveaux <sup>[34]</sup>.

- Niveau très bas :  $0 < \text{Indice CAO} < 1,1$ .
- Niveau bas  $1,2 < \text{Indice CAO} < 2,6$ .
- Niveau moyen  $2,7 < \text{Indice CAO} < 4,4$ .
- Niveau élevé  $4,5 < \text{Indice CAO} < 6,5$ .
- Niveau très élevé  $\text{Indice CAO} > 6,5$ .

Les habitudes alimentaires telles que le grignotage ont été évaluées par les mentions « jamais » « parfois » et « souvent » ainsi que la prise des sucreries entre les repas.

L'évaluation de l'hygiène buccodentaire a été faite par un indice clinique OHIS de Green et Vermillon <sup>[185], [186]</sup>, calculé en additionnant les scores de tartre et débris mous, divisé par le nombre de surfaces examinées, le résultat obtenu traduit trois niveaux d'hygiène : Bonne (0-1) - Moyenne (2-5) - Mauvaise (6-8) - Ainsi que par la fréquence de brossage. L'évaluation de la maladie parodontale a été réalisée par un paramètre semi quantitatif .

L'indice gingival GI de Loe et Silness 1967 <sup>[185]</sup> nous a permis de mesurer la sévérité et la localisation des gingivites, les scores sont ainsi définis :

- Score 0 : gencive saine, et absence de signe d'inflammation,
- Score 1 : légère inflammation léger érythème et œdème,
- Score 2 : inflammation modérée avec érythème et saignement au sondage,
- Score 4 : inflammation sévère avec érythème et œdème important.

L'examen des paramètres salivaires a été fait par une évaluation visuelle de la viscosité de la salive non stimulée au repos et a défini deux variables, une salive visqueuse et une autre non visqueuse<sup>[42]</sup>.

Des prélèvements salivaires ont été récupérés après un jeûne d'au moins d'une heure, la salive a été récoltée toutes les trente (30) secondes après une stimulation par une mastication d'un bloc de 0,75 g de paraffine (sigma- Aldrich, Allemagne) pendant 05 minutes puis récupérée dans un gobelet gradué (Figure 13)<sup>[183], [184]</sup>.



**Figure 13: Recueil de la salive**

**(Iconographie personnelle. I Ben yelles, UDS Cherif Moulay Idriss, Tlemcen, Octobre 2015)**

Les échantillons salivaires sont ainsi mis dans des tubes Eppendorf® gradués pour la lecture du débit (Eppendorf®, Hamburg, Germany), stériles et codifiés et immédiatement conservés à 4 °C puis acheminés dans les 20 minutes vers le laboratoire de recherche de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie (BIOMOLIM) pour la mesure du pH à l'aide d'une micro électrode sensitive (InLab®423 Metteler, Toledo, OH, USA).

La lecture de la valeur du pH s'affiche sur l'écran<sup>[12], [184]</sup> (Figure 14).



**Figure 14: Mesure du pH de l'ensemble des échantillons**

(Iconographie personnelle I .Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Oct. 2015).

Tous les échantillons ont été congelés à une température  $-80^{\circ}\text{C}$ , jusqu'au moment du dosage des protéines salivaires par la méthode de Gornell, (Gornell, 1949) utilisant le réactif de Biuret, à l'aide du kit commercial (Fischer Scientific, USA). (Figure 15).

La lecture des densités optiques a été réalisée à 450 nm sur des microplaques ELISA à l'aide du lecteur Biochrom ANTHOS 2020 (Cambridge, UK) (Figure 16).



**Figure 15: Dosage protéinique par la méthode de Gornell**

(Iconographie personnelle. I .Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM.Univ Tlemcen. Oct. 2015)



**Figure 16: Lecture des densités optiques avec le lecteur ELISA Biochrom Anthos2020 (Cambridge, UK).**

(Iconographie personnelle. I.Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen, Oct. 2015)

## 6.2 Etude expérimentale

### 6.2.1 Aspect éthique

Après avoir obtenu un consentement éclairé des parents des enfants donateurs selon les règles d'Helsinki (Annexe 2).

Cette étude a été approuvée par la commission de validation des thèses en sciences médicales et le conseil scientifique de la faculté de médecine de l'université de Tlemcen.

### 6.2.2 Recrutement des malades

Notre étude expérimentale en *ex vivo* a porté sur l'étude de six (06) millions de cellules monocytaires issues de donateurs, tirés au sort à partir du masque de saisie codifiant les 515 patients composant notre échantillon initial et présentant des maladies carieuses et parodontales.

Dans un même temps, six (6) millions de cellules seront isolées à partir de patients sains (série témoins) ne présentant donc aucune lésion dentaire et/ou parodontale, tirés au sort par échantillonnage élémentaire à l'aide logiciel spécialisé « Epi info 6 ».

Ces sujets choisis, matchés par rapport au sexe et à l'âge, ont fourni des échantillons sanguins destinés à l'extraction et la différenciation des macrophages pour la culture cellulaire *ex-vivo*.

### 6.2.3 Prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin a été réalisé la matinée, au niveau du laboratoire d'analyses médicales sur des jeunes patients et leurs témoins matchés répondant au consentement éclairé. Un test d'hémoglobine glyquée a été effectué sur les donneurs afin d'écartier tout risque de diabète (annexe Analyses des patients). Le sang a été récolté dans les conditions optimales d'aseptie, conditionné dans des tubes sous-vide à EDTA (BD Vacutainer, Belliver Industrial Estate, UK), puis directement acheminé au Laboratoire de Recherche de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie dans les meilleures conditions de transport et de réfrigération<sup>[187]</sup> (Figure 17).



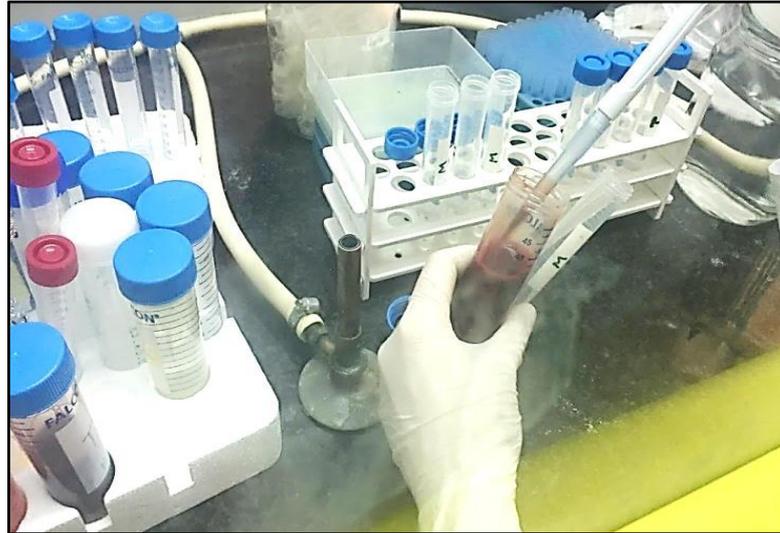
Figure 17 : Récolte de sang périphérique.

(Iconographie personnelle. I .Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM. Univ Tlemcen. Mai 2017)

### 6.2.4 Isolation des macrophages à partir des monocytes et culture cellulaire

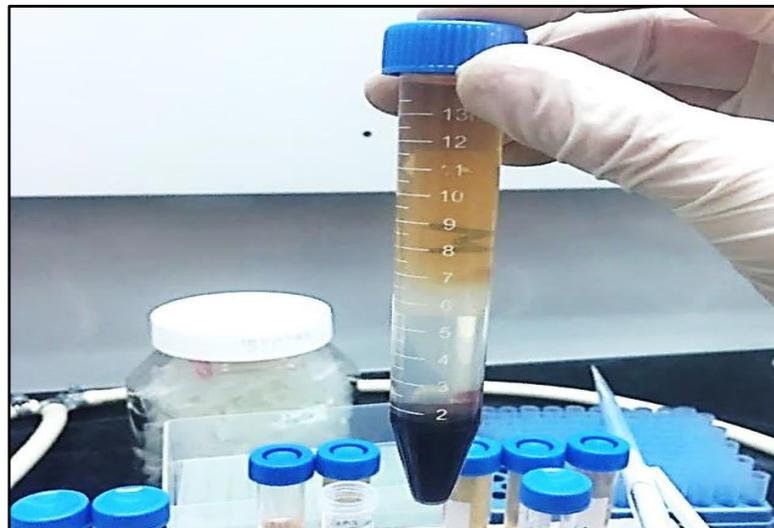
#### 6.2.4.1 Extraction des PBMCs (Peripheral Blood Mononuclearcells)

A partir du sang prélevé (Figure 18), les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été extraites par méthode de séparation de gradients de densité, le sang dilué a été déposé sur un volume égal Histopaque®-1077 (Sigma Aldrich Co, St. Louis, Etats Unis), en centrifugeant pendant 30mn à 400 t. (Figure 18).



**Figure 18: Dilution du sang par le PBS**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM. Univ Tlemcen. Mai 2017)

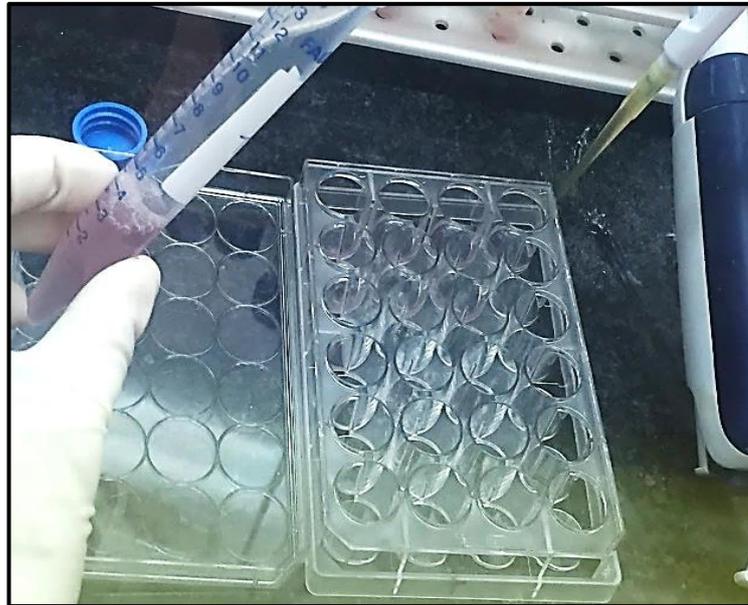


**Figure 19: Récupération de l'anneau avec les PBMC (Peripheral Blood Mononuclearcells)**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM. Univ Tlemcen. Mai 2017)

L'anneau cellulaire résultant correspond aux PBMCs séparés ; Celles-ci sont ensuite récupérées à partir de l'interface Histopaque/plasma, soumises à deux lavages (Figure.20)

par la solution PBS (Phosphate-Buffered Saline) puis transférées dans des microplaques stériles et additionnées de milieu de culture cellulaire RPMI1640 complet Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA). Cette étape est suivie d'une culture cellulaire correspondant à l'isolation des monocytes à partir des PBMCs extraits<sup>[187], [188]</sup>.



**Figure 20: Lavage des cellules**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM. Univ Tlemcen. Mai 2017)

#### **6.2.4.2 Isolation des monocytes à partir des PBMCs**

Les monocytes ont été isolés à partir des PBMCs vivantes précédemment récoltées, puis cultivés *ex-vivo* dans le milieu de culture RPMI1640 complet, contenant : 2 mmol/L de L-glutamine, 10 % de SVF décomplémenté à 56°C /30 min avec agitation toutes les 10min, 50 µg/mL de gentamycine, Pénicilline 50 U/mL, Streptomycine 50 µg/mL et de GMCSF 0.1µg/mL pour stimuler les cellules.

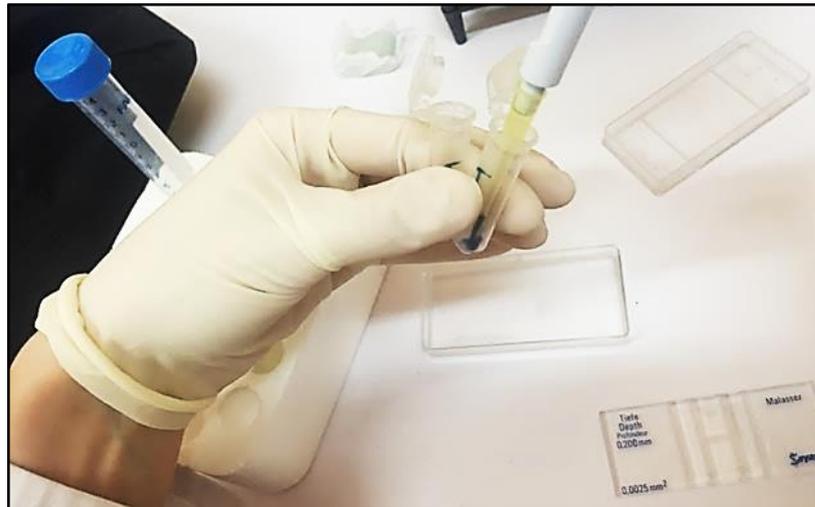
Dans les conditions optimales de culture cellulaires : à 5 % de CO<sub>2</sub> et à 37°C de température. Après deux heures d'incubation dans l'étuve spécialisée, les cellules non adhérentes ont été rejetées et les monocytes adhérents à la surface des microplaques ont été récupérés à nouveau.

#### **6.2.4.3 Test d'exclusion au Bleu Trypan**

Le bleu trypan étant un colorant soluble dans l'eau, il est utilisé principalement pour le comptage sous microscope des cellules vivantes récoltées. Ce colorant, s'infiltré dans les

membranes plasmiques endommagées des cellules mortes les faisant apparaître en bleu foncé, permettant ainsi la distinction des cellules viables et des non viables.

Afin de procéder au comptage, ce test a été réalisé sur un échantillon de monocytes récupérés après leur mise en suspension dans 1 mL de RPMI 1640, et déposé sur les cellules de Malassez, puis au niveau du microscope optique à grossissement 40 X (Optika) ; Un volume V/V de la suspension cellulaire est additionné à la solution de bleu trypan (TBET, trypan blue exclusion test) (Richardson and Fedoroff, 1997)<sup>[189]</sup> ( Figure 21).



**Figure 21: Mise en suspension cellulaire dans la cellule Malassez**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Mai 2017)

#### **6.2.4.4 Différenciation des macrophages à partir de monocytes**

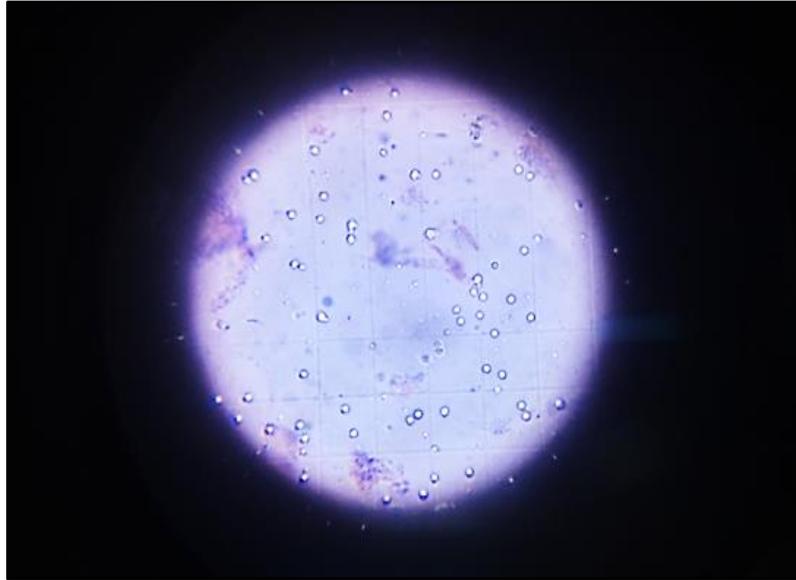
Après leur comptage (Figure 22), la concentration des monocytes en suspension dans RPMI 1640 a été ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules/mL selon la formule suivante :

$$C = n * 10^4 * f$$

C : concentration des cellules

n : nombre des cellules dans 10 rectangles

f : facteur de dilution

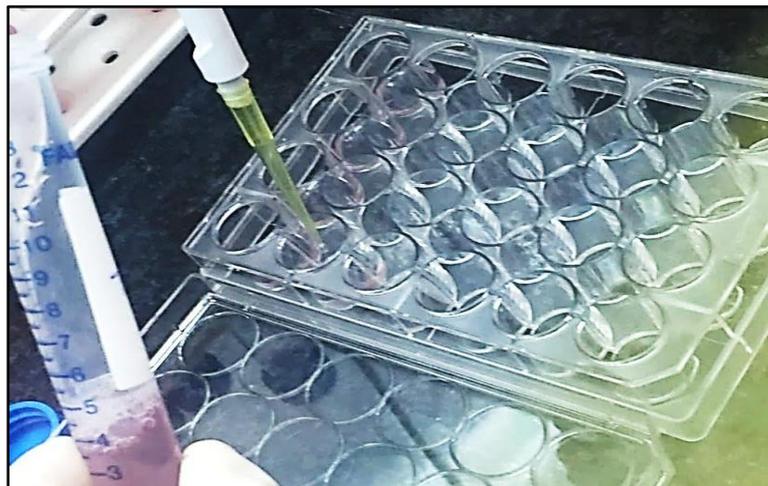


**Figure 22 : Vue microscopique des cellules pour comptage**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Mai 2017)

Ces cellules sont distribuées dans des plaques de cultures à 24 puits à raison de  $2 \times 10^6$  cellules/mL puis mises en culture dans les mêmes conditions de culture décrites précédemment pendant 48 heures<sup>[187], [188]</sup>.

On ajoute  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  dans chaque puits de solution préparée LPS pour activer les macrophages plus GMCSF ( $0.1\text{mg}/\text{mL}$ ) et RPMI complet et on incube pendant 02 heures dans une température ambiante (Figure 23).



**Figure 23 : Activation des macrophages par le LPS et GMCSF**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Mai 2017)

### 6.4.3 Traitement des macrophages par l'astaxanthine

#### 6.4.3.1 Activation des macrophages par lipopolysaccharides (LPS) et traitement à l'Astaxanthine

Afin d'activer les macrophages, on ajoute  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  de lipopolysaccharides (LPS) pendant 24h<sup>[190]</sup>.

Les macrophages en cours de différenciation à partir des monocytes ont été traités avec des concentrations graduelles d'astaxanthine, après 3 heures de culture cellulaire. L'astaxanthine rajoutée est précédemment diluée dans un solvant polaire organique approprié, le diméthylsulfoxyde DMSO (Figure 24). Une solution mère a été incorporée dans un milieu de culture afin d'obtenir les quatre concentrations suivantes : 0,1,10,50  $\mu\text{M}$  puis réincubée à  $37^\circ\text{C}$  durant 48 heures<sup>[191], [192]</sup>.

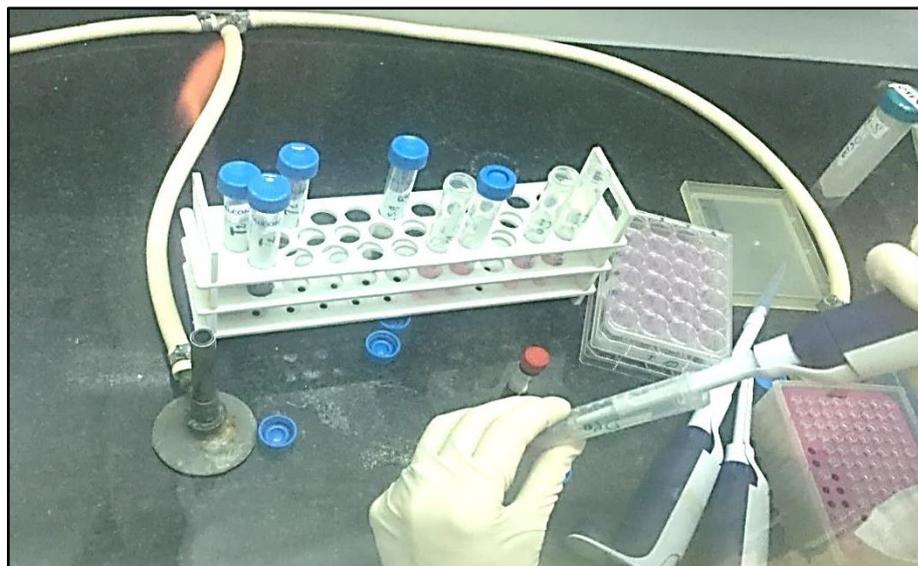
A noter que les macrophages cultivés en ex-vivo, dans cette étude ont été répartis en cinq groupes :

**LPS+ /AST-** : M $\phi$  contrôle stimulé avec LPS et non traité avec l'astaxanthine.

**LPS+ / 1  $\mu\text{M}$  AST+** : M $\phi$  stimulé avec LPS et traité avec 1  $\mu\text{M}$  d'astaxanthine.

**LPS+ / 10  $\mu\text{M}$  AST+** : M $\phi$  stimulé avec LPS et traité avec 10  $\mu\text{M}$  d'astaxanthine.

**LPS+ / 50  $\mu\text{M}$  AST+** : M $\phi$  stimulé avec LPS et traité avec 50  $\mu\text{M}$  d'astaxanthine.



**Figure 24: Supplémentation de l'astaxanthine sur les macrophages adhérents**  
(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Juin 2017)

#### 6.4.3.2 Lyse des macrophages et récupération de surnageants et de lysats cellulaires

Après 48 heures d'incubation, les surnageants des cultures cellulaires sont récupérés et aliquotés dans des tubes stériles, pour une utilisation directe ou après une courte conservation à température de  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 15 à 21 jours. Parallèlement, les lysats cellulaires des macrophages précédemment traités sont récupérés après traitement de lyse au Triton X 100 à 0,1 % durant 30 min, puis arrêt de la réaction par la solution Tris-HCl et  $\text{MnCl}_2$  aux doses respectives 25 mM, 10mM<sup>[187], [193], [194]</sup>.

Les surnageants récupérés servent pour le dosage des métalloprotéinases et les différentes cytokines par méthode de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA) afin d'établir le profil inflammatoire et l'activité des macrophages au cours du processus carieux comparé aux sujets sains. Les lysats des macrophages sont, cependant destinés à étudier les paramètres métaboliques, ceux des activités fonctionnelles et du burst oxydatif.



**Figure 25: Stockage des puits de surnageants et de lysats cellulaires pour le dosage**  
(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Juin 2017)

#### 6.4.4. Evaluation des taux de protéines totales

Le dosage des protéines totales a été réalisé suivant la méthode spectrophotométrique dite de Gornall<sup>[195]</sup>. Pour cela, les lysats cellulaires des macrophages ont été traités par le réactif A de Biuret, composé de (Hydroxyde de sodium 0,4 mol/L + tartrate de sodium 90mmol/L) et Réactif B : composé de (Hydroxyde de sodium 0,4 mol/L + tartrate de sodium 90 mmol/L + acétate de cuivre (II) 21 mmol/L + iodure de potassium 60 mmol/L), contenus dans le kit commercial utilisé (Protéines Totales, Biuret, Biosystems S.A. Costa Brava, Barcelona, Spain) (Figure 26).



**Figure 26: Dosage des protéines totales**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Juin 2017)

L'absorbance a été, ensuite, mesurée à 450 nm sur des microplaques de culture cellulaire à l'aide du lecteur ELISA spécialisé (BiochromsAnthos 2020, Cambridge, UK) (Figure 27). L'ensemble des dosages effectués était réalisé en quadruplicates, et les concentrations finales ont été exprimées en mg/mL, à partir de la courbe standard précédemment réalisée. La limite de détection du kit de dosage des protéines totales était de 0,800 g/L.



Cette étape est suivie par l'ajout en second temps de 25 $\mu$ l réactif de Griess qui absorbe le NO<sub>2</sub> en formant une coloration diazoïque rose, incubé pendant 30mn à 37°C (Figure 28) [86], [194].



**Figure 28: Dosage du monoxyde d'azote**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen Juin 2017)

#### **6.4.5.2 Evaluation de la production du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Les concentrations du peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages en culture, préalablement traités par l'AST ainsi que les contrôles non traités, ont été évaluées sur les lysats cellulaires par un dosage colorimétrique [86].

Le processus de dosage a été réalisé suivant les instructions fournies par le fabricant du kit commercial utilisé (Hydrogen Peroxide Colorimetric Assay, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (Figure 29).

Les densités optiques ont été lues à 520 nm par le lecteur ELISA des microplaques (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni). Tous les essais réalisés ont été reproduits en quadruplicates, et les valeurs finales des concentrations du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été exprimées en Micromolaire, à partir de la courbe standard réalisée par des dilutions successives de nos échantillons de cultures et des standards fournis dans le kit. La sensibilité du test H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilisé était inférieure à 51,3 ng / mL.



**Figure 29: Dosage du peroxyde d'hydrogène**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Juin 2017)

#### **6.4.5.3 Activité de la superoxyde dismutase**

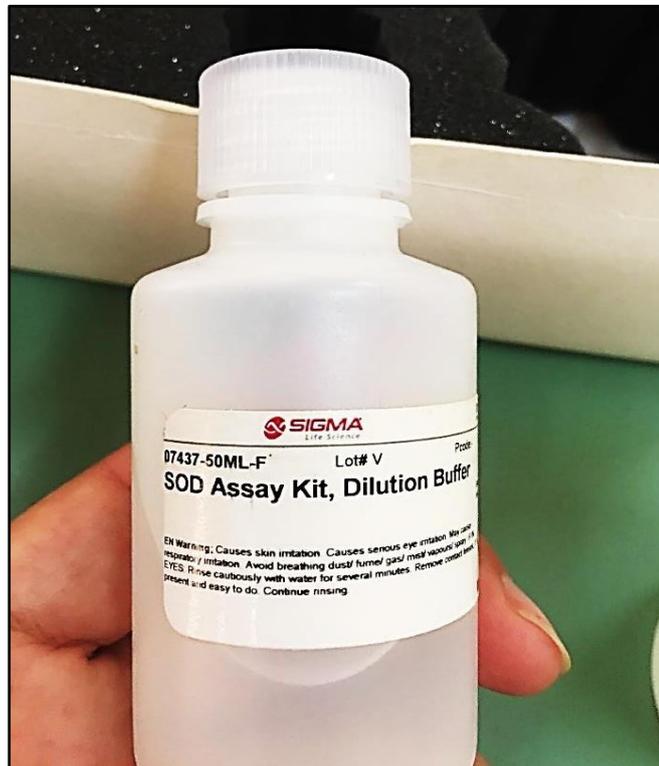
Le dosage de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) a été évalué sur les lysats des macrophages en culture, traités ou non traités avec AST, ainsi que leurs contrôles par méthode colorimétrique.

Les lysats cellulaires des macrophages cultivés dans les microplaques de 96 puits, ont été additionnés à la solution de travail [WST / solution tampon, 1/19 mL, v/v] et soumis à agitation puis complétés à une solution de travail enzymatique [ solution enzymatique / tampon de dilution , 15 $\mu$ l /2,5mL, v/v] ( Figure 30); la préparation a été mixée et incubée pendant 20min à 37°C .

L'absorbance a été mesurée à 450 nm à l'aide du lecteur de microplaques ELISA (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni). L'activité de l'enzyme SOD a été calculée selon l'équation suivante :

L'activité du SOD (Taux d'inhibition %) =  $\{[(\text{DO du Blanc 1} - \text{DO Blanc 3}) - (\text{lysate du M}\phi - \text{DO blanc 2})] / (\text{Blanc 1} - \text{Blanc 3})\} \times 100$ .

Les valeurs sont exprimées en pourcentage (%) d'inhibition.



**Figure 30: Dosage de l'activité superoxyde dismutase**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Sept. 2017)

#### 6.4.6 Evaluation de l'activité de la catalase

L'activité enzymatique de la catalase a été mesurée par l'analyse des taux de décomposition du peroxyde d'hydrogène, par spectrophotométrie sur les lysats cellulaires des macrophages en culture traités ou non par l'AST. Le dosage de l'activité de la catalase a été procédé selon les indications du fabricant du kit commercial utilisé, (Figure 31) (Catalase assay kit, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). La variation de l'absorbance a été lue sur par lecteur de microplaques ELISA, (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni) à 520 nm par rapport au blanc. Les résultats finaux de l'activité de la catalase sont exprimés en nM /min/ mL, par rapport aux concentrations du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposé en fonction du temps, et selon la

courbe standard réalisé par succession des dilutions de  $H_2O_2$ . La limite de détection du kit étant de  $0.575 \text{ mmole/minute}^{[194]}$ .



**Figure 31: Dosage de l'activité de la catalase**

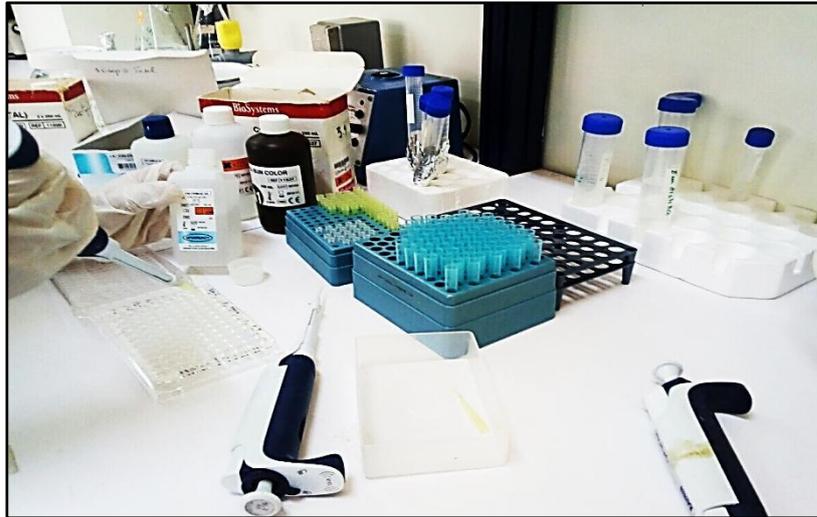
(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Juin 2017)

#### **6.4.7. Evaluation des paramètres métaboliques chez les macrophages**

##### **6.4.7.1 Evaluation des taux du calcium intra et extra- cellulaire libre**

Les niveaux des ions calcium libres intracellulaires et extracellulaires, ont été déterminés biochimiquement sur des lysats et des surnageants de macrophages en culture par méthode spectrophotométrique, comme décrit précédemment <sup>[187], [188]</sup>.

Les taux en ions calcium libres ont été mesurés par le lecteur ELISA (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni) à une longueur d'onde de 492 nm contre un blanc, en utilisant un kit commercial spécialisé (Calcium Arsenazo III, ColorometricSpinreact, SA,/S.A.U Ctrz .Santa Coloma, Espagne) (Figure 32). Les niveaux de calcium ont été exprimés en  $\text{mg/dL/temps de protéines}^{[86]}$ .



**Figure 32: Dosage du calcium intra et extra cellulaire**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Juin 2017)

#### **6.4.7.2 Evaluation des taux de glucose intra et extra -cellulaire**

Les taux de glucose intra et extra cellulaire ont été mesurés sur les lysats cellulaires, ainsi que sur les surnageants des macrophages en culture, par méthode spectrophotométrique à l'aide du kit commercial de dosage du glucose (Glucose-LQ, GOD-POD ; Liquide, Spinreact, SA./S.A.U Ctr, Spain), selon les instructions fournies par le fabricant (Figure 33).



**Figure 33: Dosage du glucose intra et extra cellulaire**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Juin 2017)

L'absorbance a été mesurée par le lecteur des microplaques ELISA à 492 nm (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni) contre le blanc. Les concentrations du glucose ont été calculées selon la formule suivante :  $\text{Echantillon} / \text{étalon} \times 100$  (concétaon)=g /dL de glucose , et les résultats du dosage ont été exprimés en nanomoles par milligramme de protéines. La limite de détection du kit de dosage étant de 0,033mg/dL.

#### 6.4.7.3 Dosage du cholestérol

La concentration du cholestérol a été mesurée par méthode spectrophotométrique, sur les lysats cellulaires de macrophages ,traités ou non avec l'astaxanthine <sup>[187]</sup> .

Un volume de 2 $\mu$  L de lysat cellulaire a été additionné à 200  $\mu$ L du réactif du kit Cholestérol oxydase / peroxydase (BioSystems S.A. Costa Brava, Barcelone, Espagne), l'incubation réalisée à 10mn à une température ambiante 37°C (Figure 34).

Les valeurs ont été exprimées par unité de la concentration (g /l) soit mmol/L, la limite de détection était de 4,2 mg/dL soit 0,109 mmol/L, et la lecture des densités optiques a été réalisée à l'aide du lecteur ELISA. (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni), à 492  $\mu$ m par rapport au blanc.

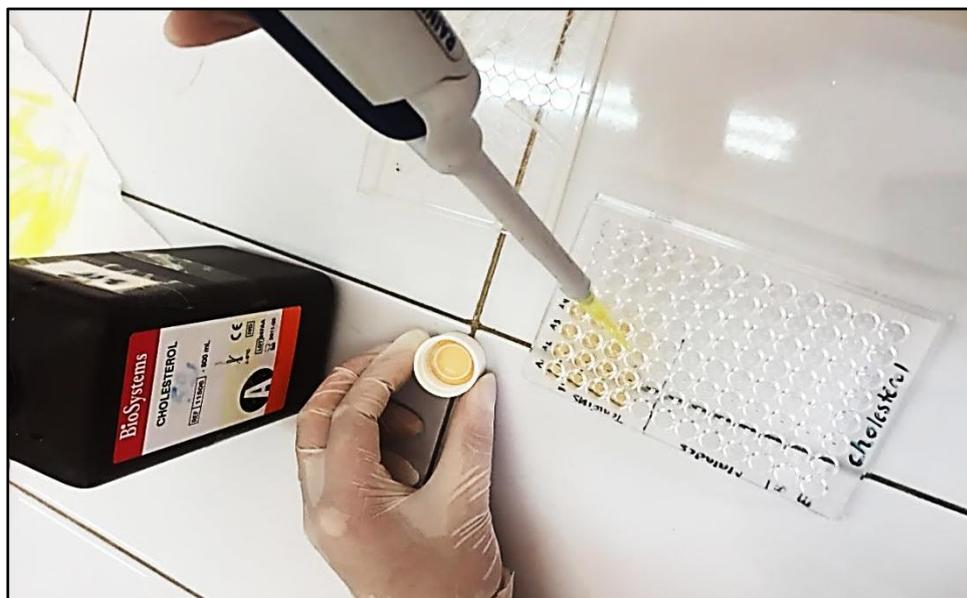


Figure 34: Dosage du cholestérol

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Juin 2017)

## 6.4.8 Marqueurs pro et anti-inflammatoires de la polarisation des macrophages M1/M2

### 6.4.8.1 Marqueur de polarisation du macrophage vers le profil proinflammatoire M1

#### 6.4.8.1.1 Dosage immunoenzymatique (ELISA) de la production de cytokines : l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, TNF- $\alpha$

Les niveaux de concentration des différentes interleukines supposées produites par les macrophages, soient l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  ont été déterminés à partir des milieux de culture cellulaire au cours du traitement graduel à l'AST. Ces cytokines ont été quantifiées par la méthode ELISA, à l'aide des kits commerciaux respectifs, selon les instructions du fabricant : BD OptEIA™ set Human IL-1 $\beta$  ; catalogue # 557 953 ; BD OptEIA™ set Human IL-6 ; catalogue # 555220 ; BD OptEIA™ set Human TNF- $\alpha$  ; catalogue # ( San Diego, CA, USA) ( Figure 35) .

Les surnageants de cultures cellulaires ont été incubés avec des volumes de (v/v)  $\mu$ L d'anticorps anti-cytokines primaires appropriés à 37 °C pendant 2h30 min sous agitation continue, puis soumis trois lavages consécutifs. Les densités optiques ont été mesurées à 450 nm avec le lecteur de microplaques ELISA (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni). Les limites de détection des kits de dosages étaient les suivants : 10 pg/mL pour l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, 2pg pour le TNF- $\alpha$ .



**Figure 35: Dosage des interleukines : l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, TNF- $\alpha$**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Mars 2018)

#### 6.4.8.1.2 Evaluation de l'activité Inductible oxyde nitrique synthase (iNOS)

Les niveaux d'expression de l'activité iNOS à été décrite précédemment , en calculant les concentrations du NO obtenus par milligramme de protéines par 30 min.<sup>[194]</sup>

#### 6.4.8.2 Marqueur de polarisation du macrophage vers le profil antiinflammatoire M2

##### 6.4.8.2.1 Dosage immunoenzymatique (ELISA) de la production de cytokines: l'IL-10

Les niveaux de concentration de l'interleukine IL-10 été déterminés à partir des milieux de culture cellulaire en supplémentation graduelle à l'AST. Ces cytokines ont été quantifiées par la méthode ELISA, en suivant les instructions mentionnées sur kit commercial BD OptEIA™ set Human IL-10 ; catalogue # 555157 (Figure 36).

Les surnageants de cultures cellulaires ont été incubés avec des volumes de 2  $\mu$ L d'anticorps anti-cytokines primaires appropriés à 37 °C pendant 2h30 min sous agitation continue, puis soumis trois lavages consécutifs. Les densités optiques ont été mesurées à 450 nm avec le lecteur de microplaques ELISA (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni). La limite de détection du kit de dosage d'IL-10 était de  $\geq 10$ pg/mL



**Figure 36: Dosage de l'interleukine 10**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Mars 2018)

#### 6.4.8.2.2 Evaluation des activités enzymatiques de l'arginase et de l'iNOS

Les lysats cellulaires récupérés après culture des macrophages ont été utilisés pour l'estimation de l'activité enzymatique de l'arginase, par méthode spectrophotométrique basée sur la détermination de la production de l'urée après l'addition de la L-Arginine comme décrit ci-après<sup>[86]</sup> Aussi, l'expression enzymatique de l'activité d'iNOS a été déterminée à partir des concentrations de NO déjà mesurées en fonction des concentrations calculées des protéines totales par 30 min L'activité de l'arginase a été mesurée par le kit commercial (UREA/BUN-COLOR, BioSystems, S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain) (Figure 37); en premier, un volume égal d'une solution d'arginine à 0,5 M est additionné au lysat des macrophages afin d'amorcer une réaction d'hydrolyse, le mixe est ensuite incubé à 37 °C pendant une heure ; puis la réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de 400 µL de solution acide. Enfin, la lecture de l'intensité de la coloration a été lue à 600 nm par le lecteur de microplaques ELISA , et la concentration de l'urée générée a été déterminée selon les formules suivantes :

Concentration de l'Urée (mg/L) = Absorbance (échantillon) / Absorbance (étalon) X 50mg/L.

L'activité de l'arginase a été calculée selon la formule qui suit : Activité d'arginase = [Concentration de l'urée en mol/L / 60 / concentration des protéines totales en mg/L] X 106. L'activité de l'arginase a été exprimée en mU urée/mg (mol/60min/mg protéines) de protéines/et celle de iNOS en (nmol /mg /30min).



Figure 37: Dosage de l'activité arginase

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Avril 2018)

#### 6.4.9 Dosage immunoenzymatique (ELISA) de la production des MMP-9 et 13

Les quantités relatives des endopeptides MMP-9 et MMP-13 libérées par les macrophages traités à l'AST comparés aux contrôles non traités, ont été estimées sur les macrophages vivants et adhérents à la surface des microplaques en utilisant des kits ELISA respectifs (Human MMP-9 Elisa kit, Human MMP-13 ELISA Kit LAB0364, Sigma Aldrich Co. St Louis, Etats Unis) (Figure 38).

Les surnageants de cultures cellulaires ont été incubés avec des volumes de 100 $\mu$ L d'anticorps anti-cytokines primaires appropriés à 37 °C pendant 2h30 min sous agitation continue, puis soumis quatre lavages consécutifs, ensuite incubés pendant 01heure avec 100 $\mu$ l d'anticorps secondaires, puis lavés quatre fois à nouveau , 100  $\mu$ l de l'enzyme HRP a été rajoutée , puis quatre lavages ont été assurés , puis le substrat de l'enzyme TMB a été ajouté et incubé pendant 30 min puis stoppé la réaction de l'enzyme 50 $\mu$ l de solution stop a été incorporée.

Les densités optiques ont été mesurées à 450 nm avec le lecteur de microplaques ELISA (BiochromAnthos 2020, Cambridge, Royaume-Uni). Les limites de détection des kits de dosages étaient les suivants : 10pg/ mlpour le MMP-9, 10pg/mL pour le MMP-13.



**Figure 38: Dosage des Métalloprotéinases 9 et 13**

(Iconographie personnelle. I Ben yelles, Laboratoire BIOMOLIM, Univ Tlemcen. Avril 2018)

## 7. Analyse statistique

### *Pour la partie expérimentale*

Les analyses statistiques ont été réalisées avec l'application du logiciel « Graph Pad Prism version 7.04 (San Diego, CA, USA) en utilisant les tests de Tucson, de comparaison non paramétrique et les ANOVA, respectivement pour la recherche des différences entre les différents groupes et entre deux groupes.

Les données ont été présentées sous forme de valeurs  $\pm$  erreur standard de la moyenne.

Les différences % sont considérées significatives pour  $p < 0,05$  (\*), très significatif pour  $p < 0,001$  (\*\*) et hautement significatif pour un  $p < 0,0001$  (\*\*\*)).

### *Pour la partie étude épidémiologique*

Les données seront recueillies sur des fiches uniformisées établies à partir d'un questionnaire.

Les valeurs obtenues à partir des données et ou support d'information seront codées soit selon un mode binaire (Oui /Non, présence ou absence) soit selon une progression géométrique pour les réponses multiples.

L'analyse des données sera réalisée pour ses parties descriptives et comparatives à l'aide du logiciel SPSS (*Graduate Pack for Windows*, version 21).

Un tri à plat va permettre de corriger les données incohérentes et de compléter les données manquantes.

### *Analyse des données de la population et application des tests statistiques :*

L'analyse descriptive des données est basée sur la transformation des variables : par regroupement en utilisant soit le codage, soit des transformations conditionnelles pour la mise en tableau et l'analyse.

L'analyse descriptive des variables se fait par le calcul des fréquences, des caractéristiques de tendance centrale ou de dispersion : la moyenne ( $m$ ), l'écart type ( $\sigma$ ) ainsi que la

détermination des intervalles de confiance (IC95%) autour de la moyenne, pour le risque  $\alpha = 0,05$  pour les variables quantitatives.

La détermination des fréquences et des intervalles de confiance pour les variables qualitatives.

### ***Analyse univariée***

Elle est utilisée pour la recherche de l'association entre deux variables indépendantes, ou encore entre une variable dépendante (à expliquer qui est la maladie carieuse et la maladie parodontale) et d'autres variables indépendantes (explicatives) tel que l'hygiène orale, nombre de brossage ect...

Les tests utilisés seront : le test  $X^2$  d'indépendance ou d'homogénéité, avec la détermination des seuils de signification.

Le test de STUDENT pour deux échantillons indépendants sera utilisé pour la comparaison des variables continues.

Des tableaux croisés 2 x 2 à double contingence seront établis pour le calcul des *Odds Ratio* (OR) comme facteur d'association épidémiologique et l'établissement des intervalles de confiance autour du risque : pour un OR égal à 1 compris dans l'intervalle faisant exclure le facteur étudié comme facteur de risque puisque le risque étant considéré comme non significatif.

### ***Analyse multivariée***

Les variables liées à la maladie, pour un seuil de signification de 20%, en analyse univariée seront introduites dans le modèle final.

# **Chapitre 3**

## **Résultats & Analyses**

## Chapitre 3 : RESULTATS ET ANALYSES

### Partie expérimentale

Des macrophages provenant de donneurs sains et de patients atteints de carie et de parodontite ont été mis en culture à différentes concentrations d'astaxanthine et les niveaux de cytokines ont été mesurés dans des surnageants à l'aide d'une méthode de dosage immunoenzymatique.

### 1. Effet de l'astaxanthine sur le burst respiratoire au niveau du macrophage

#### 1.1 Effet de l'astaxanthine sur le monoxyde d'azote libéré par le Mφ

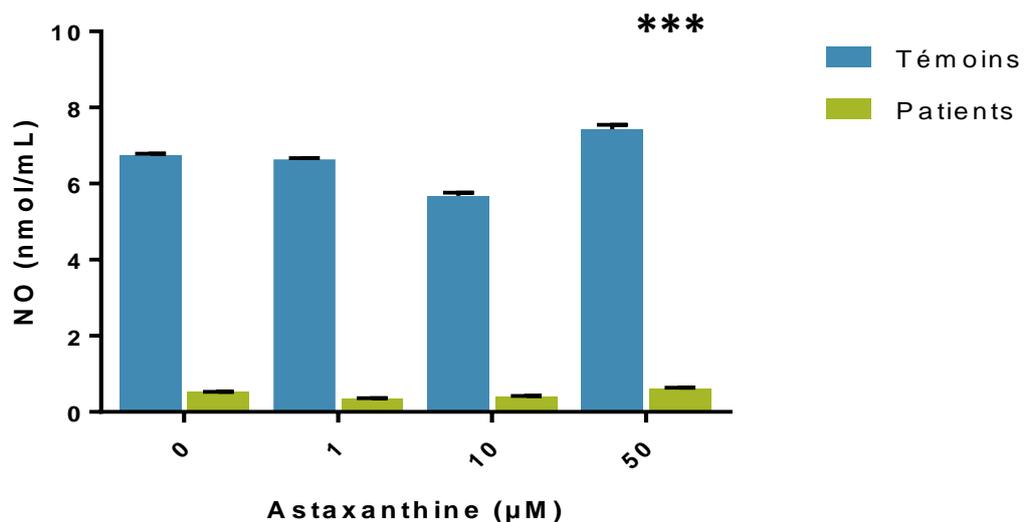
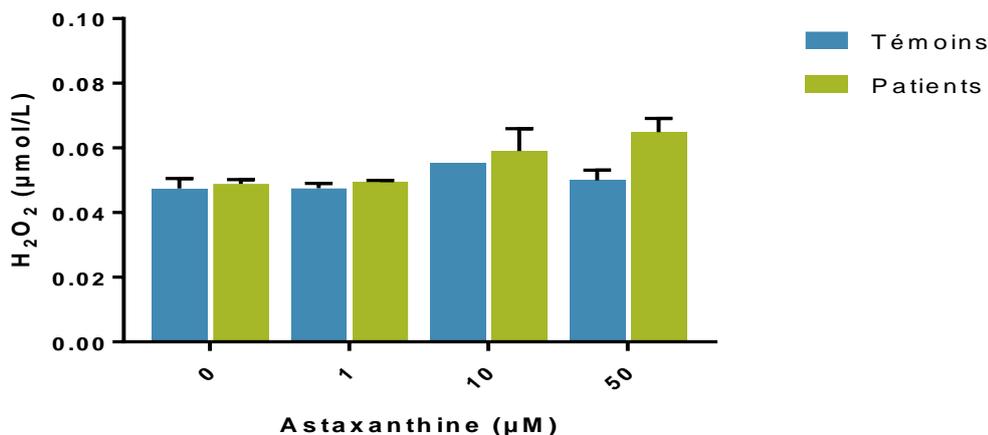


Figure 39: Effet de l'astaxanthine sur la production du monoxyde d'azote

Les résultats de la figure 39, montrent que l'activité antioxydante du macrophage provenant de la culture des malades et témoins, évalué par l'activité NO, est diminuée de façon considérable chez les patients comparés aux témoins à différentes doses.  $p < 0,0001$

Le traitement à l'astaxanthine se traduit par une régulation de l'activité respiratoire significative chez les deux cultures du macrophage.  $p < 0,0001$ .

### 1.2. Effet de l'astaxanthine sur la production du peroxyde d'hydrogène

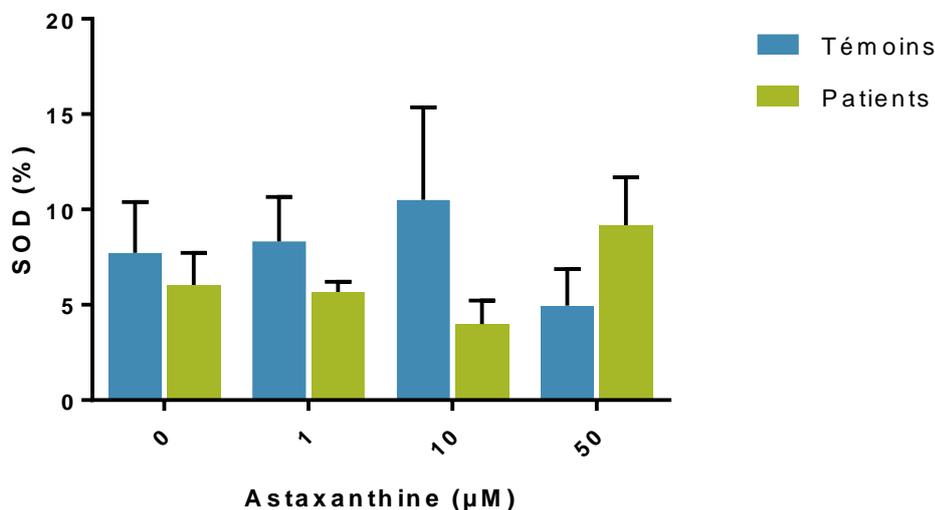


**Figure 40: Effet de l'astaxanthine sur le peroxyde d'hydrogène**

La figure 40 montre qu'il n'y a aucune différence significative entre patients et les témoins pour l'activité du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quelque que soient les doses graduelles ( $p=0,77$ ).

Le niveau de production H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> montre une différence légèrement significative entre patients et témoins ( $p=0,04$ ), quelque soit la dose administrée.

### 1.3 Effet de l'astaxanthine sur l'activité de superoxyde dismutase

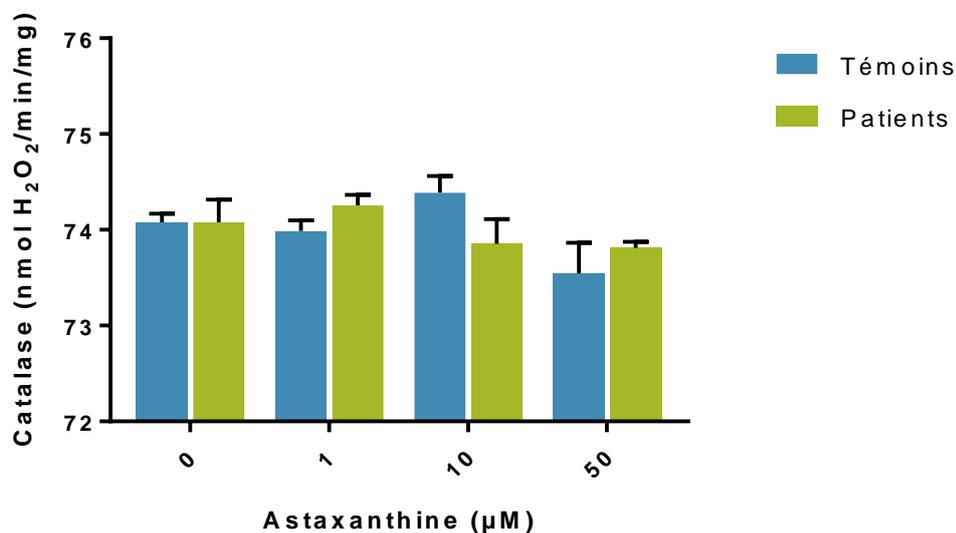


**Figure 41: Effet de l'astaxanthine sur la production du SOD par le macrophage**

Dans la figure 41, le niveau de la production de l'activité SOD, dans les deux cultures patientes et contrôles ne montre aucune différence significative ( $p=0,08$ ), ainsi qu'à

différentes doses administrés d'astaxanthine ( $p=0,14$ ). La production a légèrement diminué jusqu'à la dose 10, pour augmenter à la dose 50 contrairement aux cultures des contrôles.

## 2. Effet de l'astaxanthine sur l'activité de la catalase



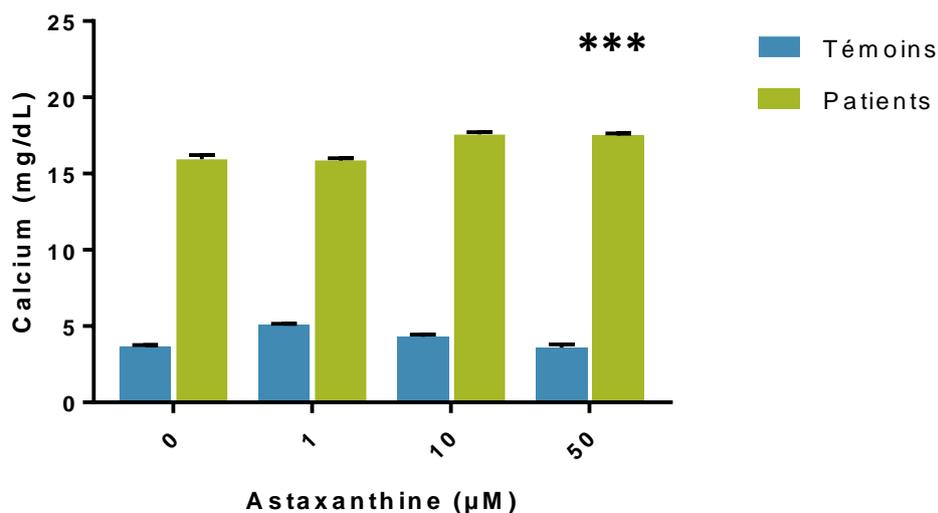
**Figure 42: Effet de l'astaxanthine sur l'activité de catalase**

Dans la figure 42, aucune différence statistiquement significative n'a été notée dans le niveau de production de la catalase entre patients et témoins ( $p= 0,0743$ ), ainsi qu'entre les différentes concentrations de l'astaxanthine ( $p>0,9999$ ).

## 3. Evaluation des paramètres métaboliques chez le macrophage

### 3.1. Effet de l'astaxanthine sur le calcium

#### 3.1.1 Effet de l'astaxanthine sur le calcium intracellulaire

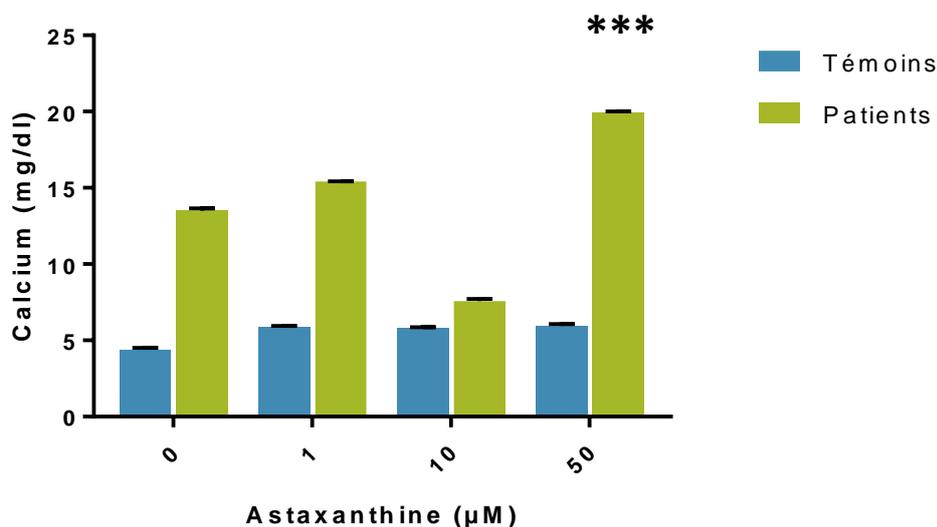


**Figure 43: Effet de l’astaxanthine sur la production du calcium intra cellulaire**

Dans la figure 43 ; on note une différence très significative entre les deux cultures du macrophage provenant des celluleu témoins comparé aux patients ( $p < 0,0001$ ) et aussi entre les différentes concentrations ( $p < 0,0001$ ).

En outre, le traitement induit une nette augmentation du niveau de production du calcium dans les cultures cellulaires des patients comparé aux témoins  $p < 0,0001$ .

### 3.1.2 Effet de l’astaxanthine sur le calcium extra cellulaire



**Figure 44: Effet de l’astaxanthine sur le calcium extra cellulaire**

On note chez le contrôle une légère augmentation de la production du calcium à la dose 1, qui reste constante jusqu’ à la dose 50, chez le patient, on assiste à une légère augmentation à la dose 1, puis devient variable pour les autres doses (Voir figure 44).

On note une différence hautement significative entre les deux cultures du macrophage des patients et témoins ( $p < 0,0001$ ) et a des différentes concentrations ( $p < 0,0001$ ).

### 3.2 Effet de l'astaxanthine sur le taux de glucose

#### 3.2.1 Effet de l'astaxanthine sur le glucose intracellulaire

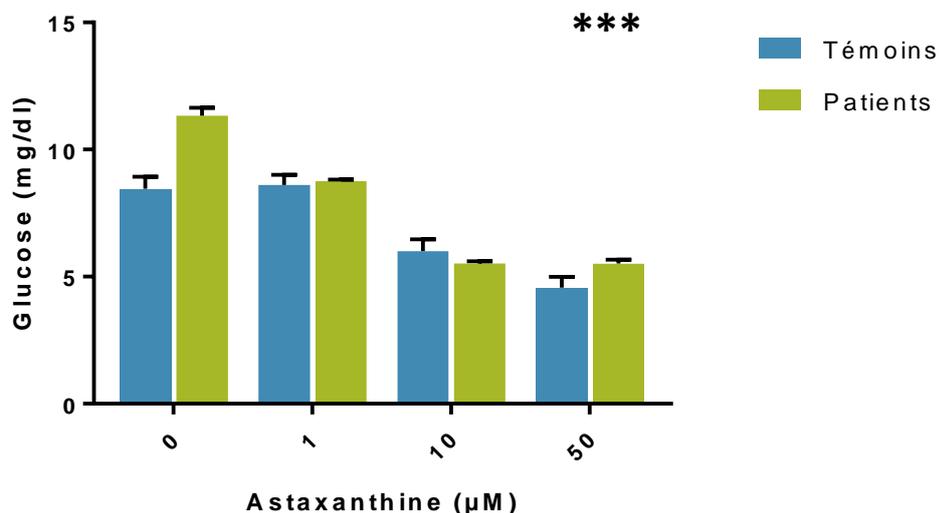


Figure 45: Effet de l'astaxanthine sur le glucose intra cellulaire

La figure 45, montre une diminution du niveau de production du glucose intracellulaire dans les deux cultures, avec une différence entre patients et témoins ( $p < 0,0001$ ) et entre les doses très significative ( $p < 0,0001$ ).

#### 3.2.2 Effet de l'astaxanthine sur le glucose extracellulaire

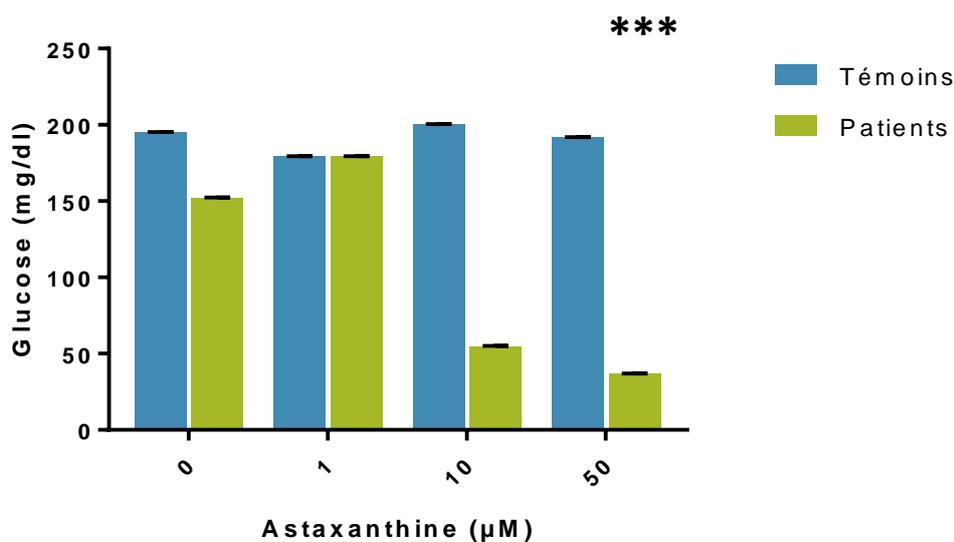
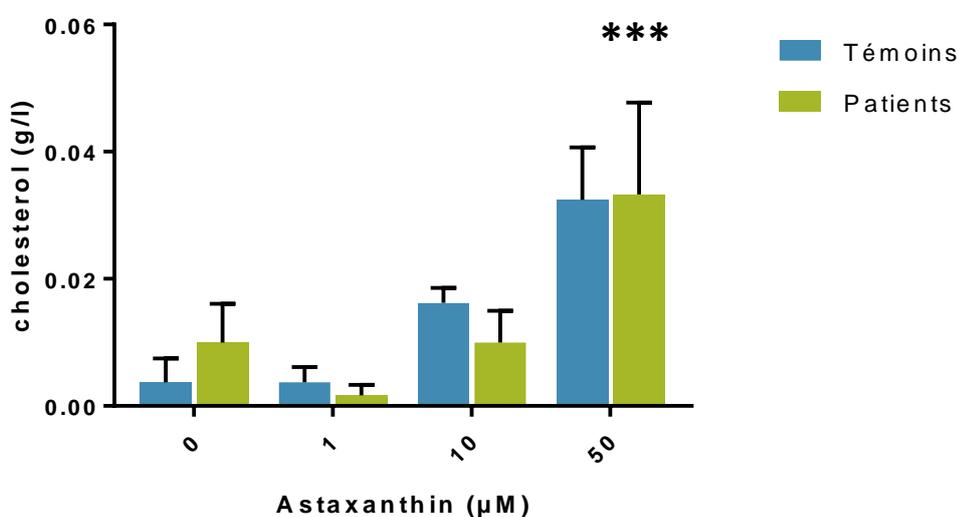


Figure 46: Effet de l'astaxanthine sur le glucose extracellulaire

Sur la figure 46, on remarque une diminution du niveau de production du glucose extracellulaire chez les contrôles ; cette diminution est par contre très importante chez les patients entre la dose 1 et 50 comparativement aux contrôles.

On note une différence très significative du niveau de production du glucose intracellulaire entre les différentes concentrations de l'astaxanthine ( $p < 0,0001$ ) ainsi qu'au niveau de la production entre les deux cultures ( $p < 0,0001$ )

### 3.3 Effet de l'astaxanthine sur le taux de cholestérol



**Figure 47: Effet de l'astaxanthine sur la production du Cholestérol par le macrophage**

Comme indiqué dans la figure 47, le taux du cholestérol libéré par le macrophage des deux cultures des cellules provenant des malades et témoins est hautement significatif ( $p < 0,0006$ ).

## 4. Evaluation des marqueurs pro et anti-inflammatoires de la polarisation M1 /M2

### 4.1 Polarisation du macrophage vers le profil pro-inflammatoire M1

#### 4.1.1 Production des cytokines

#### 4.1.1.1 Effet de l'astaxanthine sur les IL-1 $\beta$

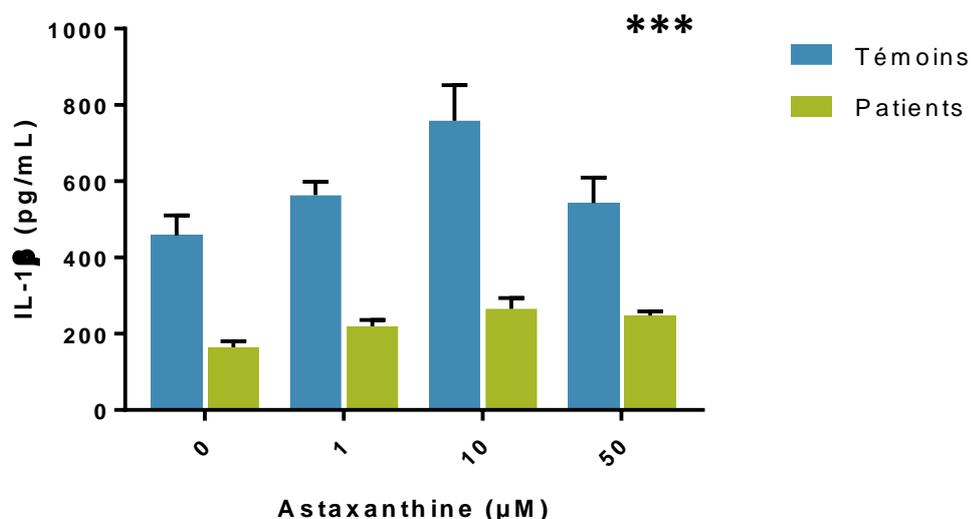


Figure 48: Effet de l'astaxanthine sur la production des IL-1 $\beta$

Les niveaux de production des IL-1 $\beta$  augmentent de la dose 0 à 10 puis diminuent légèrement chez les témoins et reste presque stable chez les patients (voir figure 48) Avec une différence hautement significative dans le taux de production d'IL-1 bêta, chez patients et témoins, en présence de plusieurs doses graduelles de l'astaxanthine,  $p = 0,0067$ ,  $p < 0,0009$ .

#### 4.1.1.2 Effet de l'astaxanthine sur les IL-6

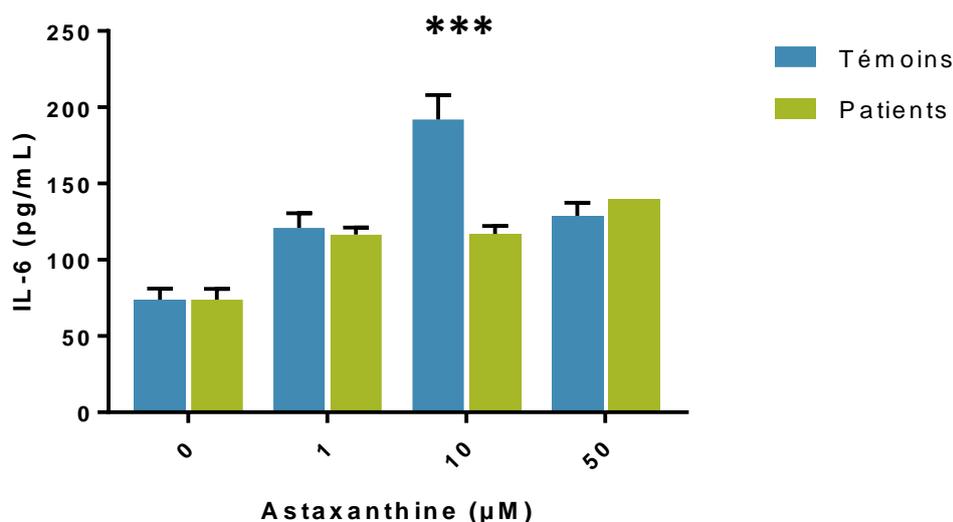


Figure 49: Effet de l'astaxanthine sur la production des IL6

Comme l'indique la figure 49, dans les deux cultures de macrophages provenant de donneurs

sains et de patients atteints de carie et de parodontite, les taux d'IL-6 étaient significativement plus faibles en l'absence d'astaxanthine que dans les cultures en présence d'astaxanthine.

La comparaison du taux d'interleukine-6 à différentes concentrations a montré une augmentation linéaire hautement significative entre les patients et les contrôles ( $p < 0,0001$ ) jusqu'à la dose 10 où elle diminue chez les contrôles et persiste chez les patients.

Les variations entre les doses et les variations entre le taux IL-6 de la même dose sont très significative  $p = 0,008$ ,  $p = 0,0001$ .

#### 4.1.1.3 Effet de l'astaxanthine sur le TNF- $\alpha$

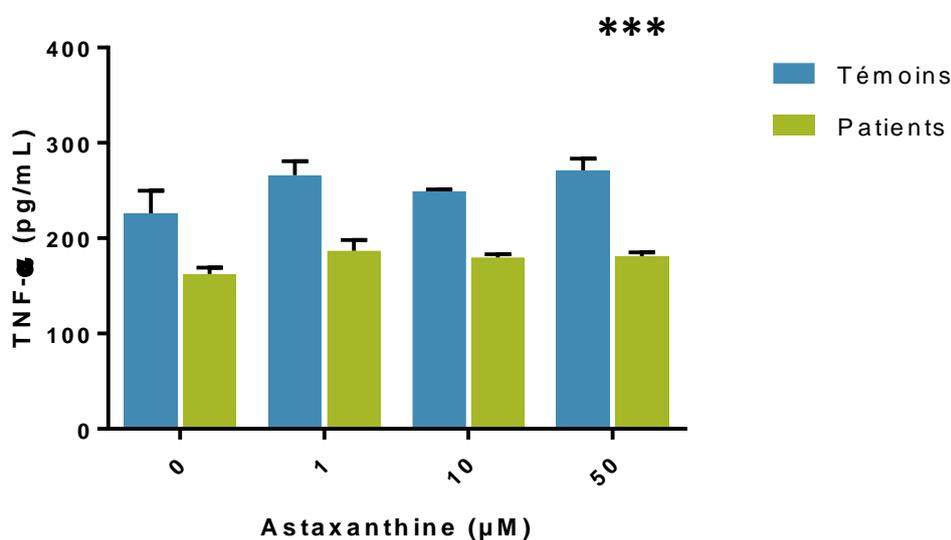


Figure 50: Effet de l'astaxanthine sur le taux de TNF-Alpha

La figure 50 montre que la production des TNF- $\alpha$  est presque constante quelque soit la dose supplémentée.

Dans les deux cultures des macrophages Le taux des TNF-Alpha est nettement significatif en présence des différentes concentrations de l'astaxanthine ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.1.2 Evaluation de l'activité enzymatique de iNOS

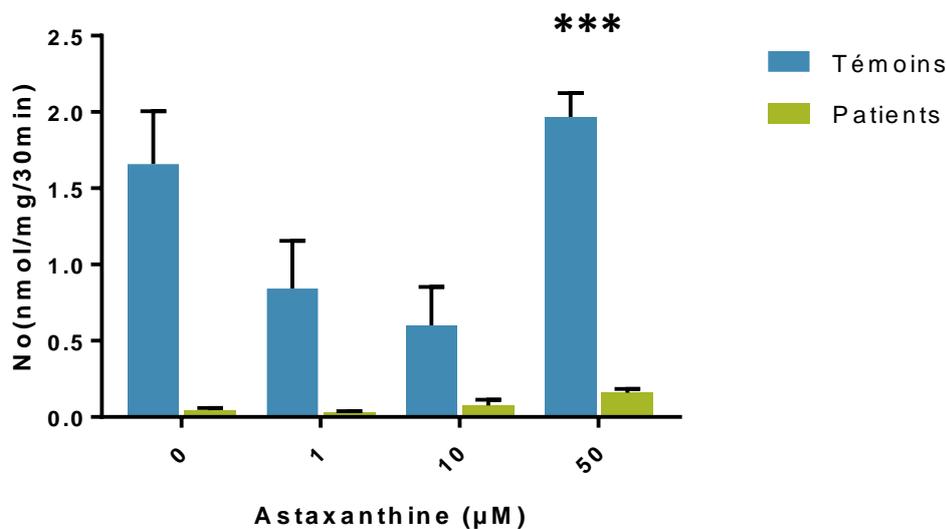


Figure 51: Dosage de l'activité iNOS

On note dans les deux cultures de macrophage provenant des donneurs sains et de patients atteints de carie une activité NOS absente chez le groupe patients par rapport aux témoins.

Une activité qui diminue de la dose 0 à la dose 10, puis augmente à la dose 50 chez le groupe témoins (voir figure 51).

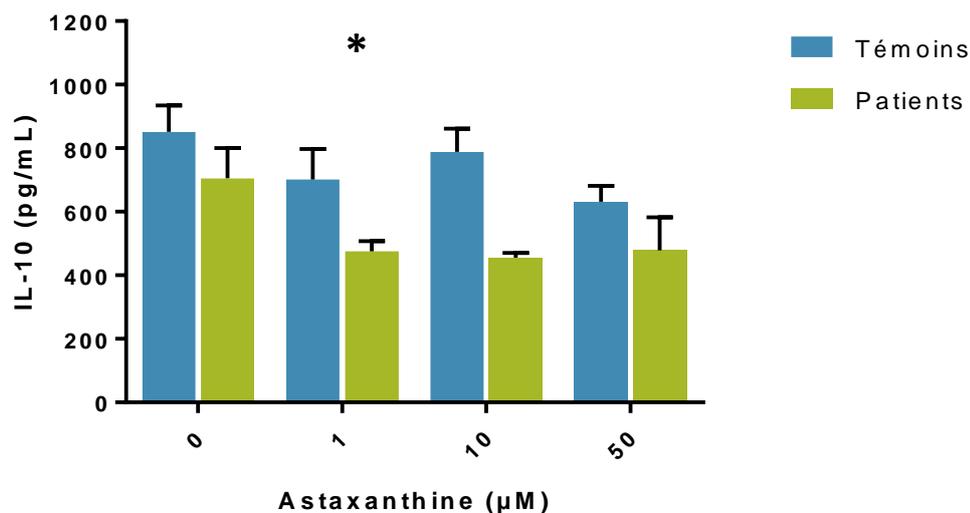
La comparaison des deux cultures, montre une différence significative entre les groupes  $p=0,002$  et très significative à différentes concentrations  $p<0,0001$ .

## 5. Evaluation de la polarisation du macrophage vers le profil anti inflammatoire M2

### 5.1 Effet de l'astaxanthine sur la production de l'interleukine IL-10

Le taux de production d'IL-10 diminue de la dose 0 à la dose 10, puis reste stable chez les patients et variable chez les témoins mais sans aucune différence significative  $p=0,04$

La différence n'est considérée significative qu'au niveau de la dose 10 où elle diminue chez les témoins et reste plus au moins stable chez les patients  $p=0,04$ .

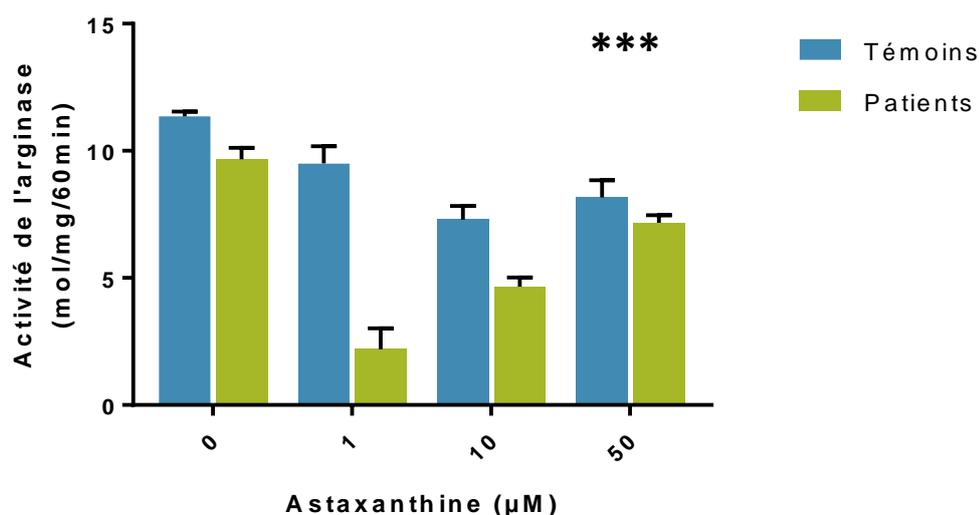


**Figure 52: Effet de l’astaxanthine sur l’interleukine 10**

Comme illustré dans la figure 52 : les niveaux de production des IL-10 augmentent à la dose 1 puis diminuent légèrement chez les patients et varient chez les témoins.

Avec une différence hautement significative dans le taux de production d’IL-10 chez patients et témoins, en présence de plusieurs doses graduelles de l’astaxanthine  $p=0,0009$ ,  $p=0,04$ .

### 5.2 Effet de l’astaxanthine sur l’activité de l’arginase



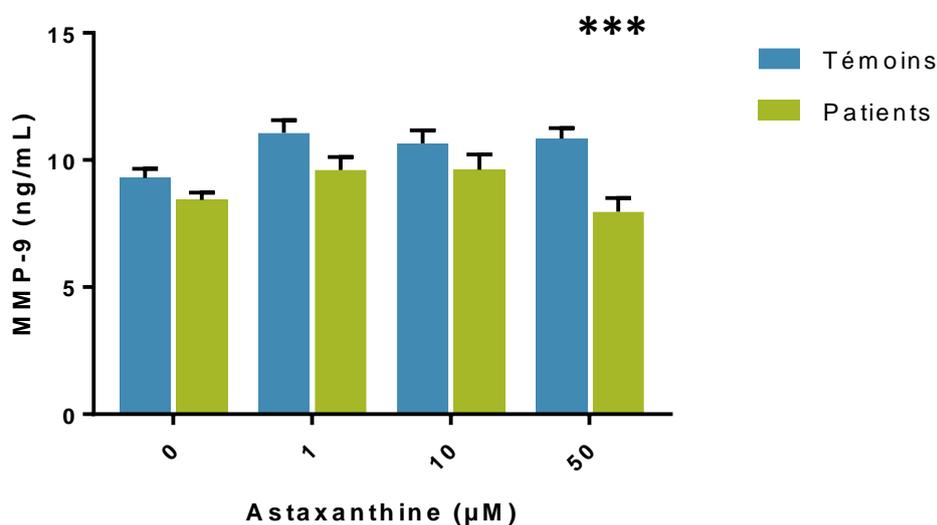
**Figure 53: Effet de l’astaxanthine sur l’activité de l’arginase**

Dans la figure 53, nous observons que le niveau d'activité de l'arginase diminue dans les cultures des cellules provenant des malades et des témoins.

De plus, le traitement à l'astaxanthine a entraîné une différence très significative chez les deux échantillons malades et témoins ( $p < 0,0001$ ) et entre les différentes doses, surtout au niveau de la dose 1 chez les patients, ( $p < 0,0001$ ).

## 6. Production des métalloprotéinases

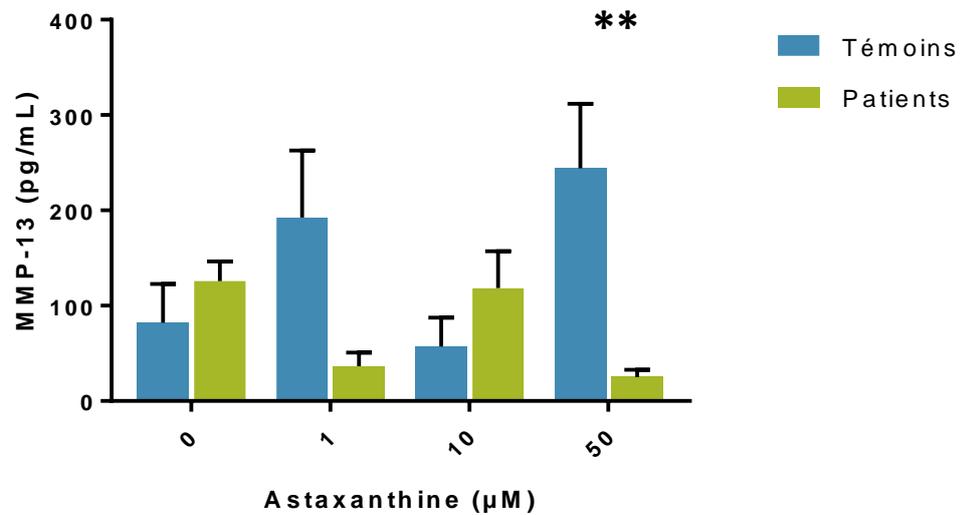
### 6.1 Effet de l'astaxanthine sur la production des métalloprotéinases 9



**Figure 54: Effet de l'astaxanthine sur la libération des MMP-9 par les macrophages**

Au niveau de la figure 54, nous remarquons que le taux des endopeptides libérés par les macrophages est presque constant entre les doses 10 et 50, où on assiste à une diminution considérable, chez les patients. Par contre chez les témoins, elle reste presque constante jusqu'à la dose 50 ( $p < 0,0001$ ).

## 6.2 Effet de l'astaxanthine sur la libération des métalloprotéinases 13



**Figure 55: Effet de l'astaxanthine sur la libération des MMP13 par les macrophages**

Le taux des métalloprotéinases 13 libérés par le macrophage cultivé à partir des cellules provenant du patient et témoins varient d'une dose à une autre (figure 55).

Quand il augmente chez le témoin, il diminue chez le patient et vice versa. ( $p < 0,0025$ )

## 2. Partie épidémiologique

### 2.1 Description de l'échantillon

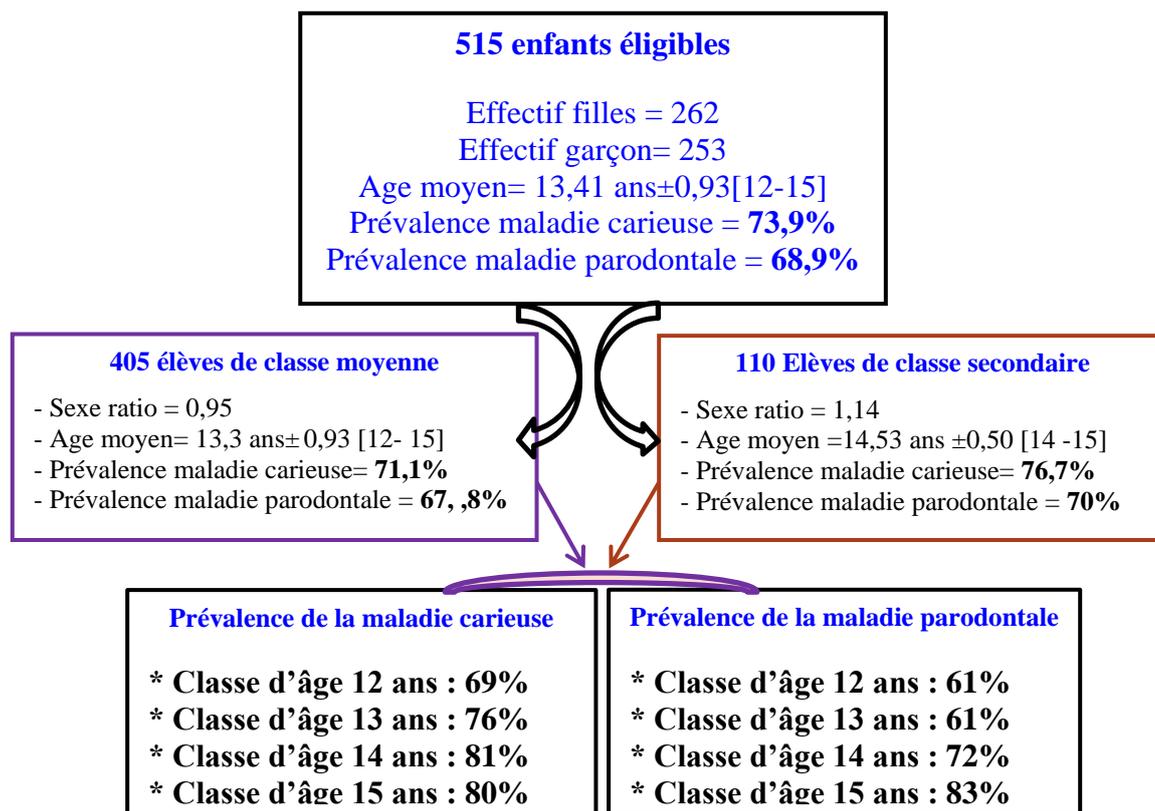


Figure 56: Description de l'échantillon enquêté

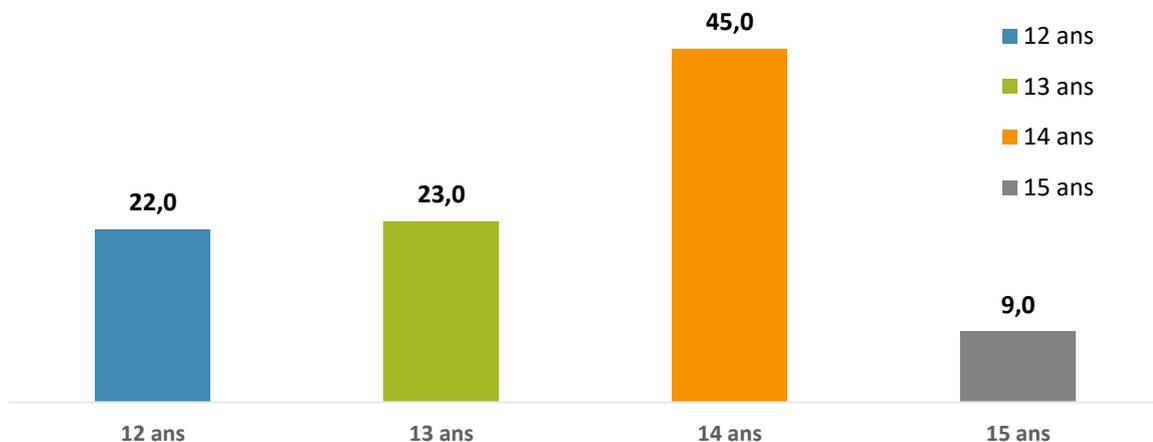
Cinq cent quinze enfants éligibles à l'étude dont quatre cent cinq de classe moyenne, et 110 de classe secondaire, avec sexe ratio 0,95 et de 1,14 respectivement pour les deux niveaux, la moyenne d'âge est de 13,3 ± 0,93 allant de 12 à 15 ans, pour le niveau scolaire moyen est de 14,53 ± 0,50 allant de 14 à 15 ans pour le niveau secondaire.

La maladie carieuse est retrouvée chez 73,9% des élèves dont 53% de sexe féminin et 47% masculin.

La prévalence de la lésion carieuse est de 69%, 76%, 81% et 80 % chez les classes d'âge respectives 12, 13, 14 et 15 ans. La répartition de la maladie carieuse par niveau scolaire est de 50 %, 69%, 72%, 80%, 77% respectivement pour le niveau 1<sup>ière</sup>, 2<sup>ième</sup>, 3<sup>ième</sup> et 4<sup>ième</sup> année moyenne et première année secondaire. Par contre, la fréquence de la maladie parodontale est 68,9% dont 47% de sexe féminin, 53% de sexe masculin ( Figure 56).

## 2. Répartition des paramètres socio-démographiques

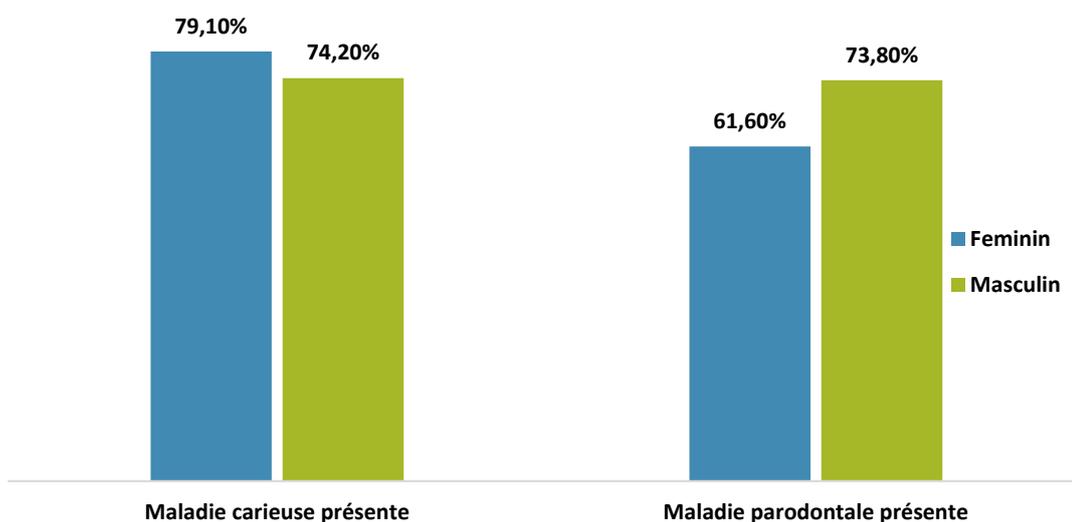
### 2.1 Répartition de la population selon l'âge



**Figure 57: Répartition de la population selon l'âge**

La moyenne d'âge de la population étudiée est de 13,3 ans  $\pm 0,93$  allant de 12 à 15 ans (Figure 57).

### 2.2 Répartition des deux maladies selon le sexe

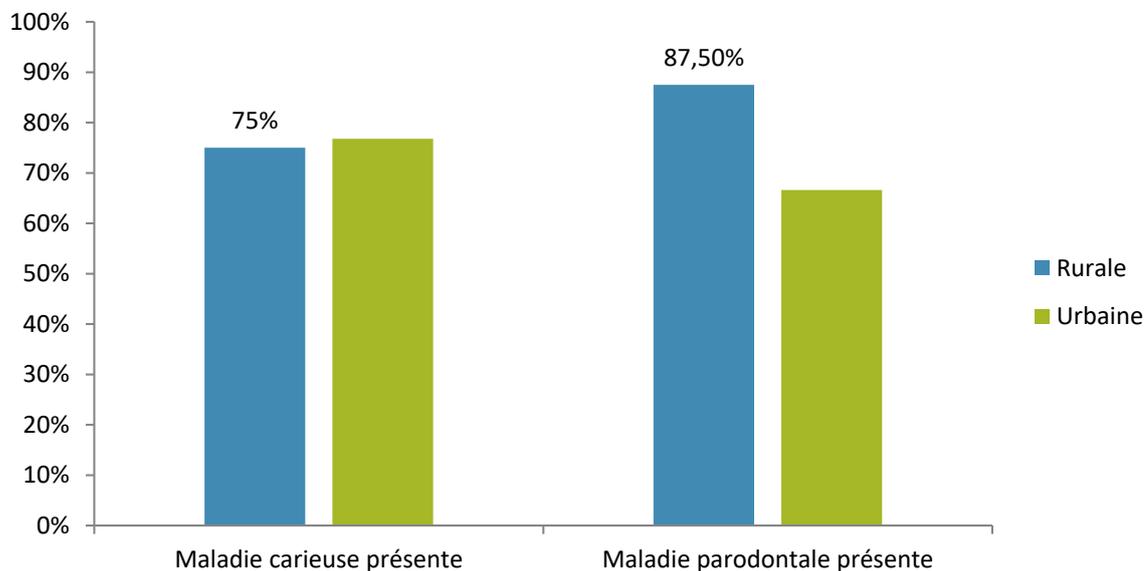


**Figure 58: Répartition des deux maladies selon le sexe**

Nous constatons que la maladie carieuse est présente à une fréquence presque égale chez les filles et les garçons, respectivement 79,10%, 74,20%. Par contre, dans la maladie

parodontale, on note une prédominance chez le sexe masculin 76,80% VS 61,60%5 (Figure58).

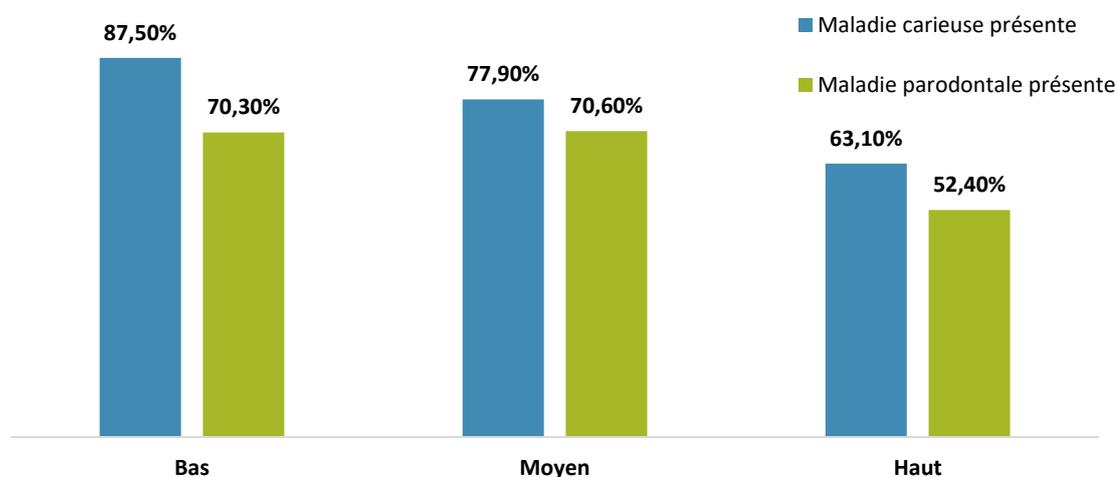
### 2.3 Répartition des affections bucco-dentaires selon la zone



**Figure 59: Répartition des affections bucco dentaires selon les zones (urbaines et rurales)**

La maladie carieuse est présente à une même fréquence dans les deux zones : urbaine et rurale, par contre la maladie pardontale est prédominante dans la zone rurale :87,50% VS 66,60 (Figure 59.) .

### 2.4 Répartition des deux maladies selon le niveau socio-économique



**Figure 60: Statut socio-économique de la population**

Nous remarquons que pour la répartition des deux maladies, plus le niveau socio-économique diminue plus la fréquence des deux maladies augmente. (Voir la figure 60).

### 3. Répartition des paramètres de l'hygiène orale

#### 3.1 Fréquence des maladies selon le nombre de brossage

Selon les résultats obtenus, les enfants qui ne se brossent jamais les dents présentent un taux le plus élevé de la maladie carieuse 84,60% et la maladie parodontale (90,10%) contrairement à ceux qui se brossent trois fois par jour ; ces deux fréquences sont nettement diminuées (Figure 61).

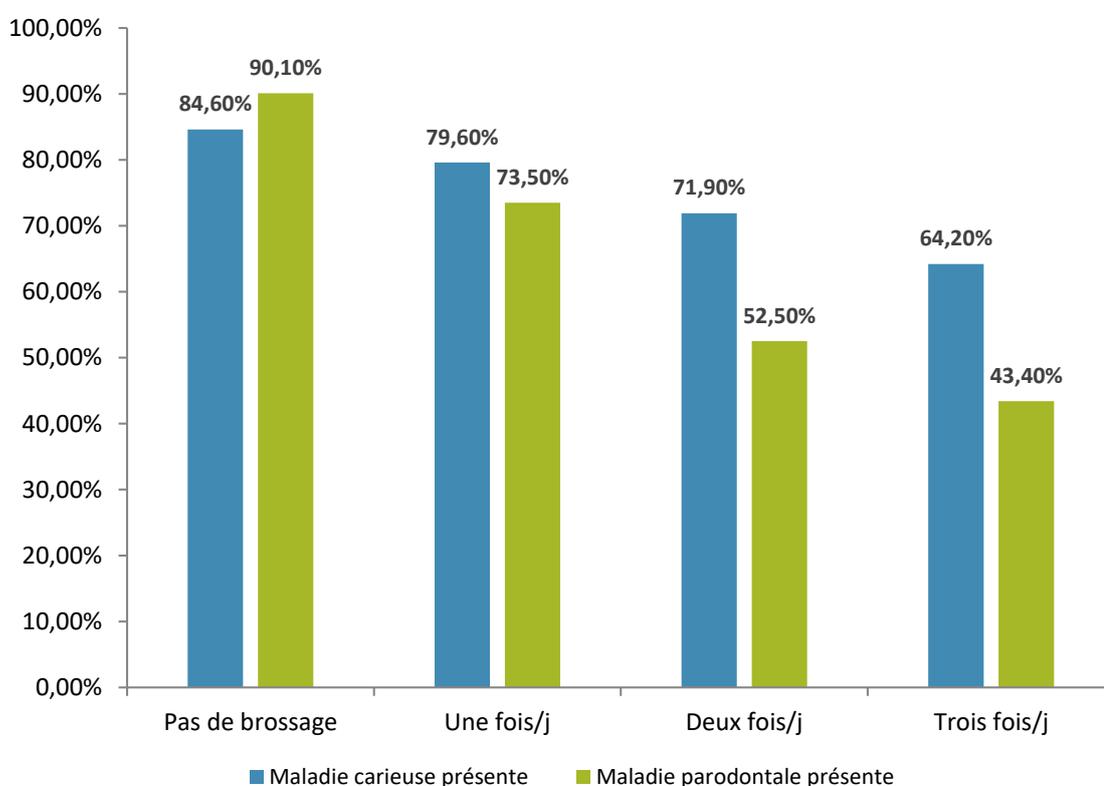
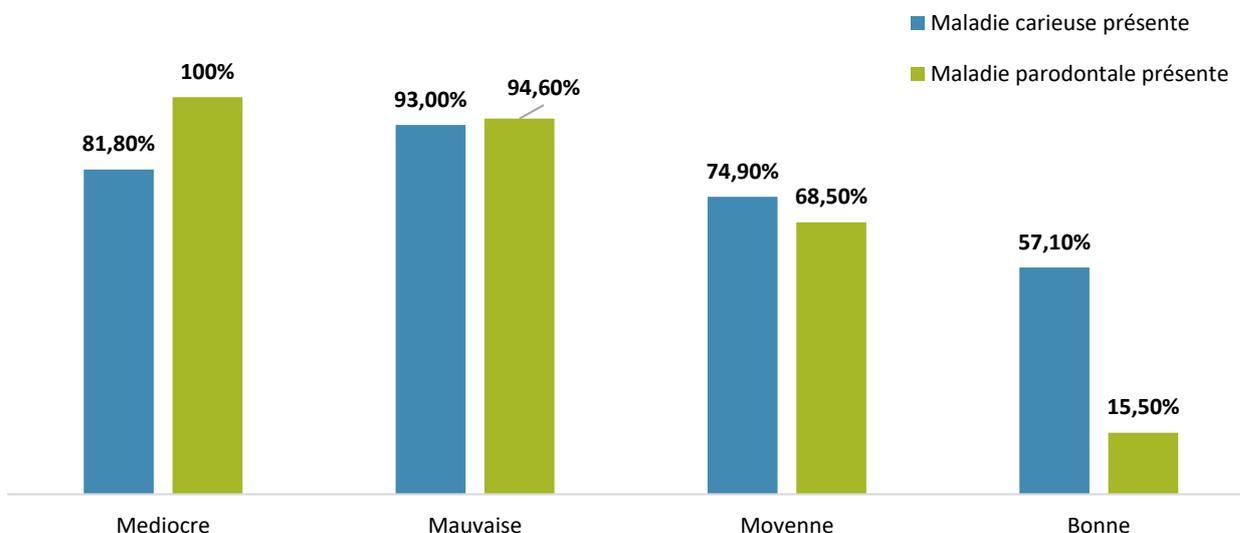


Figure 61: Fréquence des maladies selon le nombre de brossage

### 3.2 Répartition de la qualité de l'hygiène orale chez les deux maladies



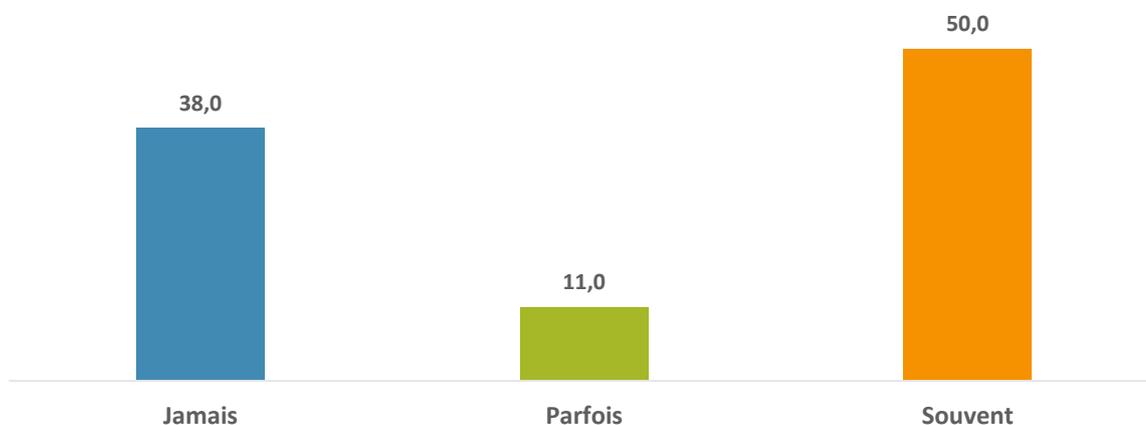
**Figure 62: Répartition de qualité de l'hygiène orale chez les deux maladies**

On observe que la maladie parodontale diminue presque de 6 fois chez les enfants présentant une bonne hygiène orale par rapport à ceux ayant une hygiène orale médiocre.

En présence d'une hygiène mauvaise et médiocre, la maladie parodontale et la maladie carieuse sont à une fréquence égale (Figure 62).

## 4. Etude des habitudes alimentaires

### 4.1 Répartition de la fréquence du grignotage dans la population d'étude



**Figure 63: Répartition de la fréquence du grignotage selon la population**

50% Cinquante de la population sont connus par une fréquence de grignotage très importante (voir figure 63).

#### 4.2 Répartition de la fréquence de l'alimentation sucrée dans la population d'étude

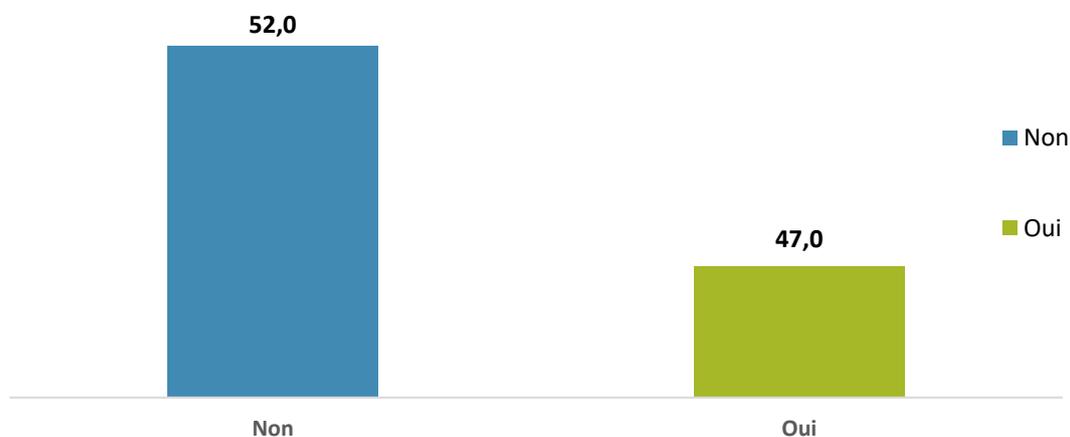


Figure 64: Répartition de la fréquence de l'alimentation sucrée dans la population

47% des enfants interrogés ont un régime alimentaire sucré (Figure 64).

## 5. Etude des paramètres salivaires

### 5.1 Répartition du pH en fonction de la présence de la maladie carieuse et parodontale

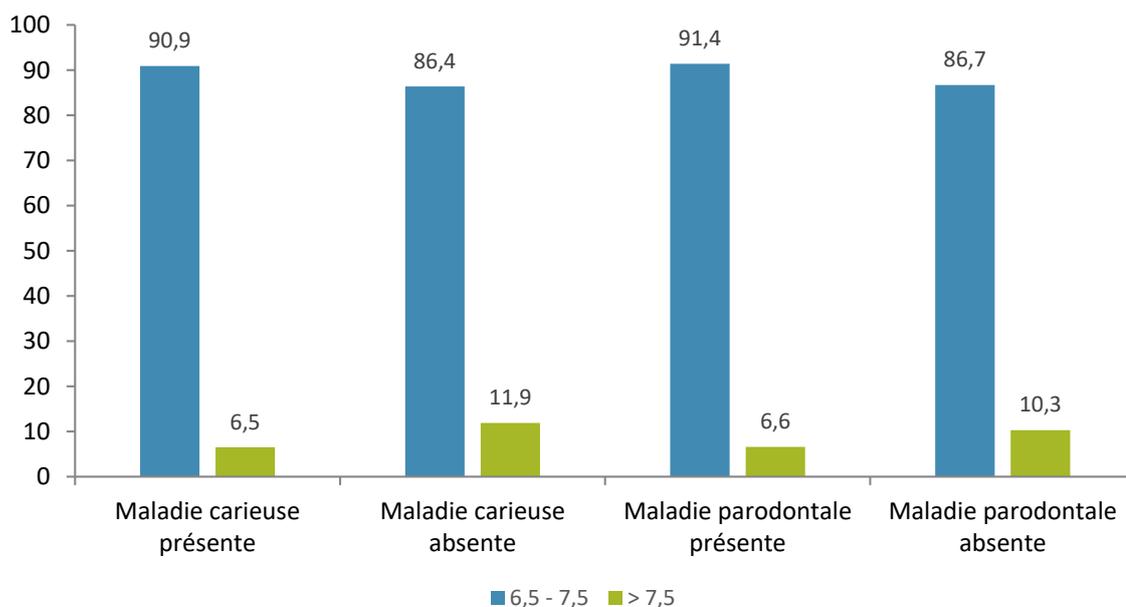
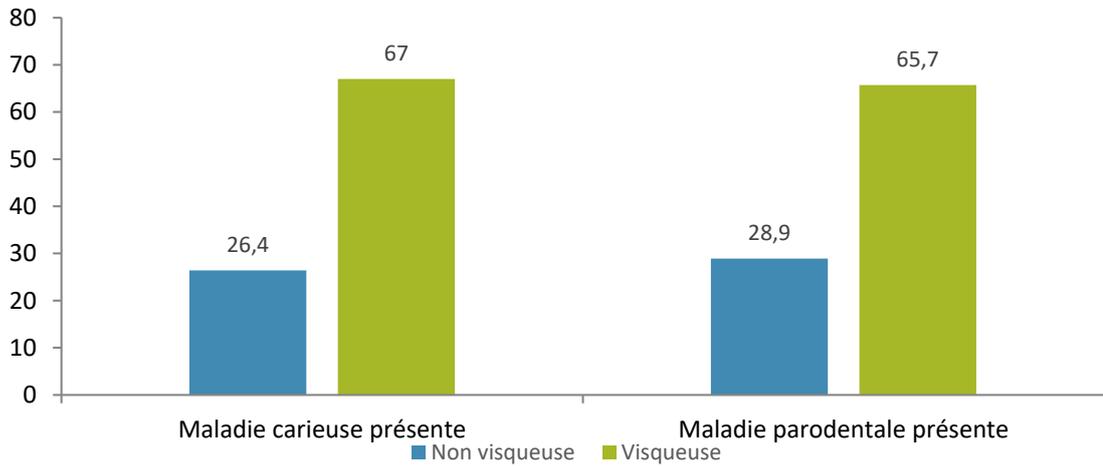


Figure 65: Répartition du pH en fonction de la présence de la maladie carieuse et parodontale

On note que le pH salivaire neutre est prédominant dans les deux maladies, Ou presque la totalité de la population d'étude présente un pH compris entre 6,5 et 7,5 (Figure 65).

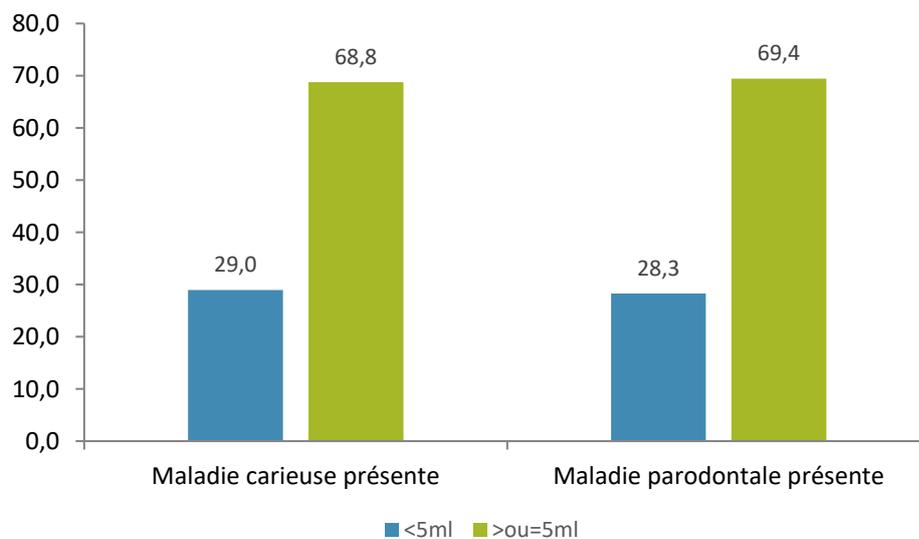
**5.2 Répartition de la viscosité en fonction de la présence la maladie carieuse et parodontale**



**Figure 66: Répartition de la viscosité salivaire en fonction de la présence des deux maladies**

Plus que la moitié de la population ayant la maladie présente une salive visqueuse (Fig66).

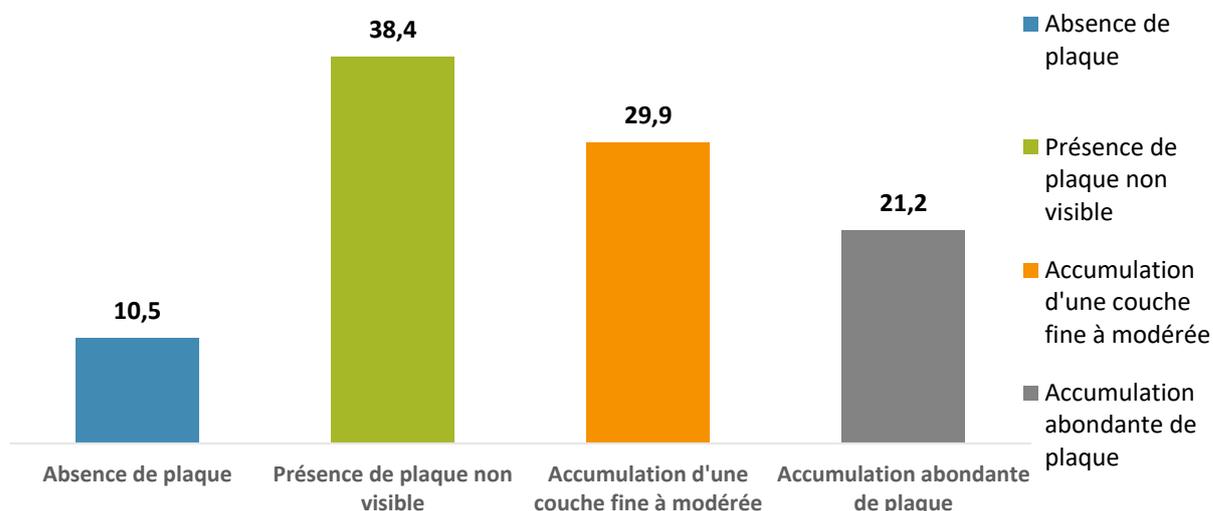
**5.3 Répartition du débit salivaire en fonction de la présence de la maladie carieuse et la maladie parodontale**



**Figure 67: Répartition du débit salivaire sur toute la population**

28,2 % de la population présente un débit salivaire < 5 mL VS 69,7% présentant un débit salivaire  $\geq$  5mL (Figure 67).

#### 5.4 Répartition de l'Indice de plaque de la population d'étude



**Figure 68 : Répartition de l'indice de plaque de la population d'étude**

La répartition de l'indice d'hygiène PI montre que 38,4% de la population présente une plaque non visible, suivi d'un indice de (30%) d'une fine couche modérée de plaque puis 21,2% de plaque abondante, et seulement 10,5% de la population présente un indice 0 de plaque absente (Figure 68).

#### 5.5 Répartition de l'Indice CAO Moyen selon des classes d'âge et sexe

Le CAO global retrouvé dans la population est défini moyen selon les travaux de Bessaid et coll 2015<sup>[34]</sup>.

Le calcul du CAO en fonction de la tranche d'âge a montré qu'il est moyen pour la tranche d'âge de 13 ans et élevé pour la tranche d'âge de 12, 14, 15 ans.

En fonction du sexe le CAO moyen est identique pour les deux sexes (Tableau IV).

**Tableau IV : Répartition du CAO moyen selon les classes d'âge et sexe**

Classe d'âge	Effectif	CAO Moyen
12 ans	115	4,66
13 ans	119	3,87
14 ans	234	4,52
15 ans	47	5,08
<b>Sexe</b>		
Féminin	263	4,46
Masculin	252	4,05
<b>CAO global</b>		<b>= 4,45</b>

## 6. Etude de facteurs de risques

### 6.1 Analyse uni variée

La maladie carieuse et parodontale sont des affections très complexes, plusieurs facteurs interviennent dans l'apparition de ces maladies. La sélection des facteurs pertinents devient de ce fait difficile car certains facteurs de confusion (facteurs liés à la fois aux véritables facteurs de risque et à la maladie) peuvent masquer l'effet du véritable facteur de risque.

La synthèse de plusieurs résultats des différentes études épidémiologiques a permis de répertorier les principaux facteurs de risque en quatre catégories :

- Facteurs liés au statut socio-démographique.
- Facteurs liés aux paramètres de l'hygiène orale.
- Facteurs liés aux habitudes alimentaires.
- Facteurs liés aux facteurs salivaires.

### 6.1.1 Caractéristiques socio démographiques

L'étude de l'association entre les paramètres socio démographiques et la maladie carieuse, ne montre aucune différence de risque pour les deux variables : sexe et la zone d'habitat, par contre le niveau socio-économique élevé, représente un facteur protecteur, le risque de développer une lésion carieuse est diminué de presque 4,5 fois chez les personnes ayant un niveau socio-économique élevé [OR 0,22= (IC 95% ; 0,08-0,54) ;  $p=0,001$ ],

L'étude de l'association entre les paramètres socio démographiques et la maladie parodontale, montre que les garçons ont un risque de développer une maladie parodontale presque deux fois plus élevé que chez les filles [OR1, 78(1,22-2,61) ;  $p=0,003$ ]

Les enfants demeurant le milieu urbain ont un risque diminué de 5 fois par rapport aux enfants qui habitent la région rurale [OR=0,19(0,04-0,84) ;  $p=0,02$ ].

Le niveau socio-économique élevé constitue un facteur protecteur de la maladie parodontale ( $p=0,005$ ) (Tableau V).

.

**Tableau V : Analyse uni variée des facteurs socio démographiques liés à la maladie carieuse et parodontale chez les enfants scolarisés âgés de 12 à 15 ans durant l'année 2015-2016.**

Maladie carieuse		Maladie présente n (%)	Maladie absente, n (%)	OR (IC95%)	pa	pb
		395	120			
<b>Sexe</b>	Féminin	209(52,9)	54(45,8)	1		0,21
	Masculin	188(47,4)	64(54,2)	0,79(0,50-1,16)		
<b>Zone d'habitat</b>	Rural	18(4,5)	6 (5,1)	1		0,92
	Urbain	379(95,5)	110 (94,9)	0,95(0,34-2,62)		
<b>Niveau socio-économique</b>	Faible	56 (14,1)	8 (6,8)	1	0,06	0,001
	Moyen	287 (72,3)	80 (67,8)	0,45 (0,20-1,04)		
	Elevé	54 (13,6)	30 (25,4)	0,22(0,08-0,54)		
<b>Maladie parodontale</b>		<b>348</b>	<b>167</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>pa</b>	<b>pb</b>
<b>Sexe</b>	Féminin	163(46,6)	100(60,6)	1		<b>0,003</b>
	Masculin	187(53,4)	65(39,4)	1,78(1,22-2,61)		
<b>Zone d'habitat</b>	Rural	21(6,0)	3 (1,8)	1		<b>0,02</b>
	Urbain	329(94,0)	162 (98,2)	0,19(0,04-0,84)		
<b>Niveau socioéconomique</b>	Faible	45 (12,5)	19(11,5)	1	0,99	<b>0,005</b>
	Moyen	260 (74,3)	107(64,8)	0,99 (0,55-1,80)		
	Elevé	45 (12,9)	39(23,6)	0,45 (0,22-0,90)		

OR :Odds Ratio, IC95% : intervalle de confiance; pa : seuil de signification des modalités de la variable ; pb : seuil de signification de la variable (test de Wald)

### 6.1.2 Caractéristiques liées à l'hygiène orale

Tableau VI: Analyse uni variée des paramètres de l'hygiène orale liés à la maladie carieuse et parodontale chez les enfants scolarisés âgés de 12 à 15 ans durant l'année 2015-2016.

Maladie carieuse	Maladie présente,	Maladie absente,	OR (IC95%)	pa	pb
	n (%)	n(%)			
	<b>395</b>	<b>120</b>			
<b>Nombre de brossage</b>					
<b>0</b>	77 (19,4)	14 (11,9)	1		
<b>1</b>	184 (46,3)	46 (39,0)	0,67 (0,34-1,32)	0,25	0,01
<b>2</b>	100 (25,2)	39 (33,1)	0,44 (0,21-0,88)	0,02	
<b>3</b>	35 (8,8)	18 (15,3)	0,31 (0,14-0,72)	0,006	
<b>Qualité de l'hygiène Orale</b>					
<b>Médiocre</b>	18 (4,5)	4 (3,4)	1		
<b>Mauvaise</b>	128 (30,5)	8 (6,8)	3,28 (1,02-10,5)	0,04	
<b>Moyenne</b>	209 (52,6)	70 (59,3)	12,5 (5,1-30,7)	0,000	<b>0,000</b>
<b>Bonne</b>	49 (12,3)	35 (29,7)	2,20 (1,32-3,69)	0,002	
<b>Maladie Parodontale</b>	<b>348</b>	<b>167</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>pa</b>	<b>pb</b>
<b>Nombre de brossage</b>					
<b>0</b>	82 (23,4)	9 (5,5)	1		
<b>1</b>	170 (48,6)	60 (36,4)	0,27 (0,12-0,60)	0,001	
<b>2</b>	73 (20,9)	66 (40,0)	0,11 (0,04-0,24)	0,000	<b>0,000</b>
<b>3</b>	24 (6,9)	29 (17,6)	0,07 (0,03-0,19)	0,000	
<b>Qualité de l'hygiène Orale</b>					
<b>Médiocre</b>	22 (6,3)	56 (3,9)	1	0,99	
<b>Mauvaise</b>	123 (35,1)	88 (53,3)	85743512,9 (0,000)	0,000	<b>0,000</b>
<b>Moyenne</b>	191 (54,6)	70 (42,4)	129,5 (44,29-378,6)	0,002	
<b>Bonne</b>	14 (4,0)		11,65 (6,11-22,19)		

OR :Odds Ratio, IC95% : intervalle de confiance ; pa : seuil de signification des modalités de la variable ; pb : seuil de signification de la variable (test de Wald)

Pour l'association des facteurs de l'hygiène orale avec la maladie carieuse : les enfants qui se brossent plus de trois fois par jour les dents, ont un risque diminué de 14 fois par rapport à ceux qui ne se brossent jamais [OR=0,07(0,03-0,19) ; **p=0,000**].

Nous remarquons que le risque de cariosusceptibilité diminue quand le nombre de brossage augmente, il diminue de presque 60%, quand le nombre de brossage est de deux fois par jour, idem quand la fréquence est supérieure ou égale à trois par jour.

Nous constatons que le risque de développer une lésion carieuse diminue par rapport à la mention « médiocre ». Le risque existe quel que soit la qualité de l'hygiène orale le risque

diminue quand l'hygiène orale est bonne par rapport aux enfants qui ont une hygiène médiocre ( $p=0,000$ ) (voir le tableau VI).

Pour l'association avec la maladie parodontale : quand la fréquence de brossage augmente, le risque d'avoir la maladie parodontale diminue ( $p=0,000$ ).

L'étude de l'association de la maladie parodontale et les paramètres de l'hygiène orale, a montré que quelque soit, le degré de cette dernière, le risque existe, mais il diminue quand la qualité de l'hygiène bucco dentaire est bonne.

### 6.1.3 Caractéristiques liées aux habitudes alimentaires

**Tableau VII: Analyse uni variée des habitudes alimentaires liés à la maladie carieuse chez les enfants scolarisés âgés de 12 à 15 ans durant l'année 2015-2016.**

Maladie carieuse		Maladie présente,	Maladie absente,	OR (IC95%)	pa	pb
		n (%)	n (%)			
		395	120			
Grignotage	Jamais	150 (37,8)	47 (39,8)	1		
	Parfois	36 (9,1)	22(18,6)	0,54(0,29-0,95)	0,03	<b>0,008</b>
	Souvent	211(53,1)	47(41,5)	1,42(0,90-2,11)	0,12	
Alimentation sucrée	Oui	190(47,9)	56(47,5)	1		
	Non	207 (52,1)	61(51,7)	0,96(0,63-1,46)		<b>0,87</b>

OR : Odds Ratio, IC95% : intervalle de confiance ; pa : seuil de signification des modalités de la variable ; pb : seuil de signification de la variable (test de Wald).

L'étude de l'association de la maladie carieuse avec les habitudes alimentaires a montré que le risque de cariosusceptibilité augmente quand la fréquence de grignotage augmente (Tableau VII).

### 6.1.4 Caractéristiques liées aux facteurs salivaires

L'étude de l'association des paramètres salivaires avec la maladie carieuse et parodontale n'a montré aucune relation statistiquement significative, hormis la viscosité : les enfants ayant une salive non visqueuse ont un risque de deux fois plus de développer une maladie carieuse par rapport à ceux ayant une salive visqueuse [OR=1,90(1,22-2,94) ;  $p=0,04$ ]. (Voir tableau VIII).

**Tableau VIII: Analyse uni variée des facteurs salivaires liés à la maladie carieuse chez les enfants scolarisés âgés de 12 à 15 ans durant l'année 2015-2016.**

		Maladie présente, n (%)	Maladie absente, n(%)	OR (IC95%)	pa
<b>Maladie carieuse</b>		<b>395</b>	<b>120</b>		
<b>pH</b>	<b>6,5-7,5</b>	361(90,9)	102 (86,4)	1	0,06
	<b>&gt;7,5</b>	26 (6,5)	14 (11,9)	0,52(0,26- 1,04))	
<b>Débit</b>	<b>&lt;5mL</b>	115(29,0)	30(25,4)	1	0,43
	<b>≥5mL</b>	243(68,8)	86(72,9)	0,82(0,51-1,32)	
<b>Viscosité</b>	<b>Oui</b>	266(67,0)	64 (54,2)	1	<b>0,04</b>
	<b>Non</b>	105(26,4)	48(40,7)	1,90(1,22-2,94)	
<b>Maladie Parodontale</b>		<b>348</b>	<b>167</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>pa</b>
<b>pH</b>	<b>6,5-7,5</b>	320 (91,4)	143(86,7)	1	<b>0,13</b>
	<b>&gt;7,5</b>	23 (6,6)	17(10,3)	0,60(0,31-1,16)	
<b>Débit</b>	<b>&lt;5mL</b>	99 (28,3)	46(27,9)	1	0,89
	<b>≥5mL</b>	243(69,4)	116(70,3)	0,97(0,64-1,47)	
<b>Viscosité</b>	<b>Oui</b>	230(65,7)	100(60,6)	1	0,41
	<b>Non</b>	101 (28,9)	52(31,5)	1,18 (0,78-1,78)	

## 6.2. Analyse multivariée

Après avoir effectué une régression logistique pour sélectionner les variables potentiellement associées avec l'apparition de la maladie carieuse et la maladie parodontale, toutes les variables pour lesquelles un lien significatif inférieur ou égal à 20% ( $p \leq 20$ ), ont été mis en évidence lors de l'analyse uni variée sont retenues dans ce modèle.

Le modèle multi varié concerne les variables suivantes : le niveau socioéconomique, grignotage, hygiène buco dentaire, fréquence de brossage, l'indice de plaque, le pH, viscosité (Tableau V, VI, VII, VIII de l'analyse uni variée),

Le résultat de cette analyse ne met en évidence sur l'ensemble des facteurs étudiés que deux facteurs associés qui constituent un risque de cario susceptibilité à savoir la salive visqueuse et l'hygiène orale médiocre, par contre pour la maladie parodontale, seule l'hygiène bucco-dentaire médiocre constitue un facteur important dans la genèse des parodontopathies. (Tableau IX et Tableau X).

**Tableau IX: Etude des facteurs associés avec la maladie carieuse : Variables sélectionnées par la régression logistique ascendante pas-à-pas, Analyse multivariée**

	Modalités	<i>p</i>	OR ajusté*	IC95%	<i>pa</i>
<b>Niveau socio-économique</b>	Faible	0,07	0,43	1	0,02
	Moyen	0,009	0,25	0,17-1,09	
	Elevé			0,09-0,71	
<b>Hygiène buccodentaire</b>	Bonne			1	<b>0,000</b>
	Moyenne	0,10	2,79	0,81-9,57	
	Mauvaise	0,000	10,52	4,23-26,15	
	Médiocre	0,02	1,95	1,10- 3,44	
<b>Viscosité</b>	Non			1	0,005
	Oui		1,98	1,23-3,18	

*OR* : Odds Ratio, IC95% : intervalle de confiance ; *p* : seuil de signification des modalités de la variable ; *pa* : seuil de signification de la variable (test de Wald)

**Tableau X: Résultats de l'analyse multivariée : Etude de l'association des facteurs de risque de la maladie parodontale chez les enfants scolarisés âgés de 12 à 15 ans au niveau des écoles rattachés à l'EPSP de Tlemcen durant l'année 2015-2016**

	Modalités	<i>P</i>	OR ajusté*	IC95%	<i>pa</i>
<b>Hygiène buccodentaire</b>	Bonne	0,10	67957500,27	1	0,000
	Moyenne	0,000	119,46	0,000-	
	Mauvaise	0,000	11,08	40,02-356,56	
	Médiocre			5,62- 21,86	

*OR* : Odds Ratio, IC95% : intervalle de confiance ; *p* : seuil de signification des modalités de la variable ; *pa* : seuil de signification de la variable (test de Wald)

# **Chapitre 4**

## **Discussion**

## Chapitre 4 : DISCUSSION

Notre travail est scindé en deux parties, il s'agit bien d'une étude hybride, comportant en première partie, sur un essai thérapeutique dans des conditions *ex vivo*, visant à bloquer le mécanisme des enzymes responsables des deux lésions suscitées et une deuxième partie portant sur une étude de prévalence et des facteurs de risque de la maladie carieuse et parodontale chez les enfants scolarisés âgés de 12 à 15 ans.

Comme déjà reconnu par la littérature scientifique, le macrophage est une cellule hautement productrice et sécrétrice de différents types de MMPs, dont les MMP-13 et MMP-9 principalement mis en évidence dans le présent travail. Il a été prouvé que les bactéries peuvent être à l'origine de la présence de ces molécules dans le milieu buccal qui une fois activées par des conditions d'acidité, dénaturent le collagène et peuvent être source des lésions destructrices<sup>[12], [138]</sup>.

C'est ainsi que l'infection par divers agents microbiens conduit à la migration des monocytes aux foyers infectieux et inflammatoires pour contrecarrer le développement de l'invasion microbienne ; tout en suscitant la différenciation de ces cellules monocytaires en macrophages dont l'activation fait suite à leur contact avec le milieu pathologique en impliquant leur polarisation et une variation dichotomique en profils M1 pro-inflammatoires ou M2 anti-inflammatoires modulés par ces macrophages<sup>[196]</sup>. Le macrophage est ainsi, considéré comme une cellule immunitaire par excellence qui contrôle efficacement les infections et l'élimination des cellules mortes afin de favoriser la réparation cellulaire et la cicatrisation tissulaire ; Ces cellules participent donc à tous les phénomènes pathologiques inflammatoires.

Plusieurs molécules ont été proposées pour réduire l'effet inflammatoire, généré par les métalloprotéinases libérées suite à une infection orale, citons en exemple l'astaxanthine reconnue dans la littérature pour ses effets anti-inflammatoires<sup>[162]</sup> ainsi que pour son effet immunomodulateur<sup>[149]</sup>. En effet la molécule « astaxanthine » a été proposée dans notre étude, afin de démontrer son effet sur une potentielle activation des macrophages à des concentrations différentes ainsi que son action *vis-à-vis* de l'aspect sécrétoire qualitatif et quantitatif en métalloprotéinases, responsables des deux lésions inflammatoires déjà abordées.

**Effet de l'astaxanthine sur les métalloprotéinases MMP-9 et MMP-13 :**

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs), constituent une famille de 23 endopeptidases dépendantes du zinc qui interviennent dans la dégradation de pratiquement toutes les molécules de la MEC, y compris le collagène<sup>[134],[135],[138],[197]</sup>. Elles sont classées en collagénases, gélatinases, stromélysine, matrilysines, MMP de type membranaire et autres<sup>[198]</sup>. Ces endopeptidases contribuent au développement des processus pathologiques telles que la maladie parodontale, les caries dentaires, l'inflammation de la pulpe dentaire et lésions périapicales<sup>[134]</sup>.

De plus en plus de preuves indiquent que les MMPs sont identifiées dans la dentine<sup>[138],[199]</sup>, le fluide gingival<sup>[198]</sup>, la salive<sup>[144]</sup> ou encore secrétées par des bactéries ou des macrophages en cas d'infection et pourraient être responsables de la dégradation de la matrice organique collagénique.

La MMP-13 est une collagénase 3 qui peut dégrader les composants de la MEC ainsi que divers substrats tels que le collagène et la fibronectine. L'expression collagénase a été démontrée dans la pulpe dentaire<sup>[200]</sup> et les odontoblastes<sup>[201]</sup> ainsi que dans le fluide gingival et à été aussi incriminée dans la progression de la maladie parodontale<sup>[202]</sup>.

Un travail récent a détecté la présence de MMP-13 dans la pulpe des dents saines et cariées. Une étude parallèle a aussi démontré que le polymorphisme MMP-13 (rs2252070) était associé à des caries dentaires<sup>[203]</sup>. une étude parallèle et plus récente, signale que les variations génétiques de la MMP-13 pourraient contribuer à l'augmentation des risques de susceptibilité à la carie<sup>[204]</sup>.

Par contre, dans d'autres études la MMP-9 gélatinase, a été identifiée à plusieurs niveaux dentinaires en fonction de l'étendu de la lésion carieuse<sup>[205]</sup>, des études génétiques récentes ont montré qu'un certain nombre de gènes sont associés à la susceptibilité de la lésion carieuse, la majorité des gènes sont associés à une inflammation, à une susceptibilité accrue aux infections et à la formation de matrice dentinaire. La prévalence de 6 polymorphismes mononucléotidiques dont le gène MMP-9, ont été identifiés chez 102 enfants atteints de caries<sup>[206]</sup>.

D'autre part, à l'aide d'une analyse immunohistochimique, des chercheurs ont prouvé l'importance de la MMP-9 dans la progression de la lésion parodontale après dégradation de la matrice cellulaire<sup>[202],[207]</sup>.

Cependant, ces deux enzymes sont aussi secrétées par le macrophage<sup>[208]</sup> ou la bactérie <sup>[139]</sup> suite à un processus infectieux, ou une série d'épisodes inflammatoires. Par contre, dans la réaction pulpaire, des composés bactériens et des facteurs inflammatoires peuvent stimuler la production de cytokines en augmentant l'expression des métalloprotéinases, en particulier les MMP-13, et MMP-9 <sup>[44], [134], [142]</sup>, de même il a été prouvé que l'expression des MMP-13 et MMP-9 a été largement augmentée par les cytokines lors des lésions parodontales <sup>[209]</sup>.

Ces enzymes impliquées dans la dégradation de diverses protéines de la matrice extracellulaire et jouant un rôle pathologique dans divers troubles inflammatoires, ont longtemps été considérées comme une cible thérapeutique attrayante ; De ce fait, des chercheurs ont mené une série d'études récentes sur d'éventuels inhibiteurs de protéases, comme le thé ou notamment la MMP-9, responsables des maladies cardiaques ou neurologiques<sup>[210]</sup>.

D'autres ont suggéré que la curcumine inhibe l'invasion des cellules du cancer du côlon ainsi que l'inhibition ultérieure de la MMP-9<sup>[211]</sup>.

Il a été prouvé que l'action combinée de la curcumine et la doxycycline entraînait une inhibition de l'activité MMP-9 dans les cas de parodontites <sup>[212]</sup>.

Certaines recherches affirment qu'une supplémentation en extrait de pépins de raisins pourrait améliorer la qualité de vie des patients atteints de fibrose pulmonaire en inhibant l'expression de MMP-9 <sup>[213]</sup>.

Un autre étude *in vitro* a démontré, pour la première fois, que la chlorhexidine (CHX) à des concentrations de 0,04 % ou plus a complètement inhibé l'action des gélatinases libérées lors du processus carieux et qui pourraient également être activées par le mordantage à l'acide orthophosphorique <sup>[214]</sup>.

Des études antérieures ont également prouvé l'effet anti inflammatoire de l'astaxanthine <sup>[162], [166], [178]</sup>, des résultats ont montré que l'AST pouvait aussi moduler la MMP-9 dans le cas des lésions vasculaires cérébrales <sup>[215]</sup>.

Les résultats de notre étude nous ont permis de démontrer l'effet de l'astaxanthine sur les MMP-9 et MMP-13 libérées dans les deux processus inflammatoires, nous avons obtenu une différence hautement significative pour les deux endopeptides, ceci prouve que l'action de l'astaxanthine a fortement inhibé les métalloprotéinases responsables des deux lésions.

Nos résultats concordent avec l'étude de Cheng, qui a également réduit l'expression des MMP-13 en bloquant la dégradation du collagène<sup>[192]</sup>.

Cependant, la difficulté réside dans le manque d'études similaires sur l'effet des drogues sur les métalloprotéinases impliquées dans les affections orales telles que les parodontites ou les maladies carieuses, ce qui nous permettrait d'établir une comparaison logique de nos résultats. Il serait en outre très intéressant de déterminer, à l'aide d'une étude mécanistique, d'autres endopeptides libérés lors de la lésion orale inflammatoire.

Après étude des résultats obtenus, nous montrons ainsi dans ce travail, que l'astaxanthine est capable de diminuer le taux des protéases à partir de la dose 10 chez les patients atteints de maladie carieuse et parodontale.

### **Effet de l'astaxanthine sur les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires**

Les macrophages sont principalement une source majeure de nombreuses cytokines impliquées dans la réponse immunitaire, l'inflammation et de nombreux autres processus homéostatiques. Lors de la stimulation par des micro-organismes, des produits microbiens ou des facteurs endogènes, y compris des cytokines, les macrophages peuvent synthétiser et libérer un grand nombre de cytokines (par exemple, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF alpha, IFN alpha, IFN gamma...etc).

Certaines cytokines peuvent réguler la production d'autres cytokines par les macrophages, et ce, en passant par l'activation de ces derniers soit vers un profil classique soit alternatif. Comme par exemple les IL-3, GM-CSF, IFN gamma qui provoquerait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou bien les cytokines IL-4, IL-10, IL-13, TGF bêta, qui engendrent la libération de cytokines anti-inflammatoires. De plus, ces cytokines peuvent moduler la plupart des fonctions des macrophages. Il est à noter que les macrophages peuvent être leur propre source de cytokines régulatrices<sup>[216]</sup>.

Néanmoins, dans le cas des caries dentaires et l'inflammation parodontale qui représentent des infections orales majeures causées par une infection bactérienne, des études antérieures ont rapporté une augmentation de l'expression de diverses cytokines dans les odontoblastes atteints de caries, et dans le tissu parodontal enflammé<sup>[217]</sup>. Ainsi, les cytokines ont pour rôle de générer des réponses immunitaires de l'hôte et de les maintenir contre les agents microbiens responsables de diverses infections. Les cellules vivantes de l'hôte sécrètent ces molécules sous forme de signaux pour recruter des cellules du système immunitaire (chimiokines), provoquer une inflammation (cytokines pro-inflammatoires) ou contrôler les réponses inflammatoires (cytokines anti-inflammatoires). Les réseaux de cytokines mis au

point facilitent l'éradication des microbes envahisseurs, mais maintiennent un équilibre entre le pro- et l'anti-inflammation, créant ainsi un environnement favorable à la réparation tissulaire<sup>[94]</sup>. De ce fait, les cytokines n'agissent pas isolément mais plutôt en synergie, tandis que certaines cytokines sont antagonistes avec d'autres, créant ainsi un équilibre.

Il est reconnu que la réponse fonctionnelle des odontoblastes face à la carie constitue une barrière supplémentaire à la propagation de l'infection en formant une dentine réparatrice. Récemment, d'autres études ont montré que les odontoblastes peuvent également induire des réponses inflammatoires de la carie chez l'hôte directement par la production de peptides antimicrobiens et de cytokines et indirectement par l'activation de cellules immunes migratrices<sup>[218]</sup>. Il a été conclu aussi que l'interleukine Béta-1 est reconnue comme marqueur pro-inflammatoire dans les cas de lésions dentaires carieuses<sup>[219]</sup> et parodontales<sup>[220]</sup>.

De même, l'IL-6 représente différents effets biologiques et agit comme médiateur majeur dans la réponse de l'hôte, elle augmente le niveau de la protéine C-réactive (CRP) en phase aiguë et provoque aussi une dérégulation des molécules d'adhésion, ce qui augmente la perméabilité vasculaire et l'œdème inflammatoire<sup>[216]</sup>. Des taux importants de l'interleukine 6 ont été observés dans le cas des lésions carieuses et parodontales<sup>[221]</sup>,<sup>[222]</sup>, ce taux peut être en rapport avec l'étendu et l'intensité de l'inflammation instaurée suite à l'infection contractée<sup>[223]</sup>.

Parallèlement, la cytokine TNF-alpha, qui réagit en premier plan comme déclencheur des réactions inflammatoires du système immunitaire, joue un rôle dans la production et l'activation des cytokines, des molécules d'adhésion et la régulation de la prolifération des cellules immunitaires<sup>[224]</sup>. Les données actuelles ont révélé un taux significatif de la TNF- $\alpha$  dans les formes des caries profondes<sup>[225]</sup> et les lésions parodontales<sup>[226]</sup>.

Contrairement aux autres cytokines citées ci-haut, la cytokine IL-10 est une molécule anti-inflammatoire, responsable de l'inhibition de l'action des cytokines pro inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, et le TNF $\alpha$ <sup>[227]</sup>. La production de l'IL-10 augmente pendant le processus inflammatoire et joue un rôle immuno-modulateur avec des taux qui ont été démontrés importants dans les lésions carieuses et parodontales<sup>[222]</sup>.

En revanche, il a été prouvé que la supplémentation en AST provoque des effets anti-inflammatoires dans les macrophages chez des souris stimulées par un lipopolysaccharide (LPS) en inhibant de manière significative les niveaux d'ARNm des cytokines pro-

inflammatoires, y compris l'interleukine-6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale à (TNF- $\alpha$ ) et l'IL-1 $\beta$ . En revanche, cette même supplémentation a élevé les niveaux d'ARNm de cytokines anti-inflammatoires dont celui de IL-10 dans des cellules stimulées par des LPS, toujours sur le modèle murin [228] ; D'autres travaux ont montré la diminution des taux de cytokines IL-6 et IL-10 dans le cas d'infection par *Helicobacter pilori* [166].

Nos résultats nous laissent constater une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-6) chez les macrophages des patients et des témoins traités à l'AST, avec une variance pour le TNF- $\alpha$ , molécule pro-inflammatoire, qui n'a augmenté de taux qu'à partir de la dose de 10  $\mu$ M et uniquement chez les patients contrairement aux témoins. En revanche, les taux des cytokines anti-inflammatoires IL-10 ont clairement diminué chez les patients et témoins lors des différentes doses de traitement à l'AST.

Ces données qui se résument par une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires et une baisse des anti-inflammatoires, nous permettraient de conclure que le traitement à l'AST pourrait inciter les macrophages à s'activer classiquement en profil M1 classique plutôt que vers le M2 alternatif.

Ceci est bien entendu opposé aux études abordées ci-dessus, néanmoins, notre étude repose sur un modèle humain et non murin.

Cependant nous n'avons pas trouvés nombre de travaux similaires sur les infections dentaires qui permettraient de la référer et/ou de la comparer.

### **Effet de l'astaxanthine sur la balance Arginase- INOs**

Le processus carieux et la lésion parodontale provoquent une série de réactions suite à différents stimuli bactériens ; il en résulte une réponse inflammatoire qui vise à inactiver ou détruire les organismes envahissants, éliminer les irritants et préparer le terrain pour une réparation tissulaire[229].

La réponse inflammatoire consiste en une réponse immunologique. Les principaux processus de l'inflammation sont les suivants : augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que la libération de facteurs d'activation plaquettaire, de peptides, tels que les interleukine-1, la bradykinine ; et les amines etc... [230]

L'oxyde nitrique (NO) peut jouer un rôle régulateur dans le processus inflammatoire et en particulier dans la régulation des propriétés pro-inflammatoires de l'endothélium[231] , il s'agit d'un gaz impliqué dans un grand nombre de processus biologiques, principalement comme médiateur de l'inflammation[232]. L'oxyde nitrique (NO) est généré enzymatiquement

par des synthases (NOS) qui oxydent la L-arginine en L-citrulline<sup>[233]</sup>: nNOS (neuronal; NOS1), iNOS (inductible; NOS2) et eNOS (endothélial; NOS3), la forme iNOS est indépendante du calcium, exprimée dans certains types de cellules après stimulation par la Lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* (LPS) et/ou différentes molécules comme l'interféron (IFN $\gamma$ ), l'interleukine-1 (IL-1) ou le facteur de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ). Dans les macrophages, les monocytes, l'induction d'iNOS et la présence de L-arginine sont suffisantes pour déclencher la production de NO. L'induction d'iNOS peut être aussi déclenchée par des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou par l'activation précoce de certains facteurs transcriptionnels nucléaires dont le facteur nucléaire (NF-kB). Il a été aussi admis que les glucocorticoïdes et certaines cytokines, telles que IL-10 inhibent l'induction d'iNOS<sup>[233]</sup>. L'expression de iNOS, en particulier, est impliquée dans de nombreuses affections inflammatoires et néoplasiques<sup>[232]</sup>.

Des études similaires, ont démontré que le monoxyde d'azote (NO) en quantité importante issu de iNOS, peut inhiber l'expression de nombreuses cytokines dans les lymphocytes, les éosinophiles, les monocytes et des cytokines; essentielles au développement du processus inflammatoire comme l'expression IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ , ainsi que l'expression de l'IL-6, IFN- $\gamma$ <sup>[231]</sup>.

De plus, L'arginase est une métalloenzyme de manganèse qui assure la conversion de la L-arginine en L-ornithine et de l'urée. On la trouve dans les bactéries, les levures, les plantes, localisée dans les mitochondries<sup>[234]</sup>. Les deux isoformes d'arginase ont des mécanismes similaires, l'une est cytoplasmique et principalement exprimée dans le foie, l'autre principalement mitochondriale et hautement exprimée dans les reins<sup>[235]</sup>. L'activité de l'arginase a deux objectifs majeurs: premièrement, débarrasser le corps de l'ammoniac par synthèse d'urée, et deuxièmement, produire l'ornithine, précurseur des polyamines, qui sont nécessaires à la prolifération cellulaire et les prolines produites par l'ornithine et nécessaires à la production de collagène<sup>[236]</sup>.

Une activité accrue de l'arginase et la diminution des taux de L-arginine qui en résulte peuvent également altérer la fonction immunitaire et permettre la propagation de l'inflammation en limitant l'apport de L-arginine nécessaire à la formation de niveaux cytotoxiques de NO par iNOS. Une activité accrue de l'arginase peut également limiter l'expression de iNOS en réduisant la L-arginine nécessaire à la traduction de iNOS<sup>[235]</sup>. Ainsi,

l'activation de iNOS ou l'arginase (ou les deux) reflète le type de réponse inflammatoire dans un processus pathologique spécifique<sup>[237]</sup>.

De nombreuses études de recherche se sont concentrées sur le rôle de l'arginase dans la modification de la production des niveaux de NO, car l'arginase et le NOS utilisent tous deux la L-arginine comme substrat commun. Une arginase trop active pourrait entraîner une carence en L-arginine disponible pour le NOS. Cela peut provoquer un déséquilibre de la NOS, une diminution de la production de NO, et augmentation de la production d'oxydants, superoxyde et peroxyde conduisant à un dysfonctionnement. En conséquence, de nombreuses études ont établi une corrélation entre le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire et l'augmentation des niveaux d'activité et d'expression de l'arginase<sup>[235].[238]</sup>. L'arginase joue également un rôle important dans la réduction de la production de NO par iNOS<sup>[237]</sup>. Par conséquent, une augmentation de l'activité de l'arginase et / ou de la diminution des niveaux de production de NO pourrait être utilisée comme un bon marqueur de l'efficacité des anti-inflammatoires ou pour vérifier le rôle des molécules bioactives soupçonnées avoir un effet anti-inflammatoire ou immuno-modulateur<sup>[187]</sup>.

En revanche, suite à la perception des signaux de danger, en cas d'infection générée par des bactéries buccales, deux principaux types de macrophages sont reconnus :

- \* Les macrophages classiques (M1), produisant de l'oxyde nitrique et du NO.

- \* Les macrophages M2, où l'activité de l'arginase est principalement exprimée ; L'ornithine, le produit de l'arginase, fait intéressant, exprime un niveau élevé d'arginase mitochondriale<sup>[234]</sup>. Il a été admis aussi que l'AST exerce une fonction anti oxydative et anti inflammatoire qui réduit de manière significative la charge bactérienne en renforçant ainsi la réponse immunitaire<sup>[148]</sup>.

Nous avons observé dans notre étude, que le traitement par l'AST à des doses graduelles au niveau des macrophages de patients atteints à la fois de la maladie carieuse et de maladie parodontale comparés aux sujets sains ou témoins, entraînait une diminution significative des activités enzymatiques de iNOS jusqu'à la dose 10 µM puis une augmentation ultérieure. Pareillement, une diminution de l'activité de l'arginase a été remarquée avec des doses inférieures à 10 µM, jusqu'à augmentation significative entre 10 et 50 (µM). En même temps, nous avons remarqué une augmentation du rapport Arginase/iNOS relatif au RATIO M2/M1 chez les macrophages de patients par rapport à ceux de sujets sains traités respectivement à l'AST au niveau de toutes les doses étudiées. Étant donné que les macrophages (M2)

alternativement activés sont caractérisés par une faible activité de l'iNOS et de production de NO, ainsi que par une forte activité de l'arginase et celle du Ratio M2/M1.

Les M1 eux, se caractérisent par leur forte activité de l'iNOS et faible activité de l'arginase, nous concluons principalement une dominance de polarisation vers le profil anti-inflammatoire M2 chez les macrophages traités à l'AST issus de patients contrairement aux macrophages issus de témoins. Par ailleurs, le traitement des macrophages par les doses 1, 10 et 50 mM chez les patients a suscité une diminution du RATIO M2/M1 par rapport aux macrophages non traités (0  $\mu$ M) et contrairement, une légère élévation du même RATIO chez les témoins par rapport à la dose 0  $\mu$ M.

De là nous arrivons aussi à proposer un effet de dose à l'AST, lui faisant varier son action sur les activités des macrophages tantôt vers un profil anti-inflammatoire, tantôt vers son versus pro-inflammatoire.

Nous ne pouvons toutefois comparer nos résultats par manque de données bibliographiques exploitables. En outre, les résultats contradictoires peuvent refléter en partie les différences dans le type de maladie étudiée et le type de cellules utilisées.

### **Effet de l'astaxanthine sur le burst oxydatif au niveau du macrophage**

Les agents pathogènes représentent les principaux acteurs impliqués dans les lésions parodontales et carieuses<sup>[229]</sup>; Citons parmi eux les espèces les plus incriminées, à savoir *Porphyromonas gingivalis* et le *Streptocoques mutans*<sup>[46], [239]</sup>, ceux-ci activent la réponse immunitaire innée par le biais de la composante moléculaire de la paroi cellulaire bactérienne, le lipopolysaccharide (LPS)<sup>[240]</sup>. En effet, après cette invasion bactérienne, il résulte un stress oxydatif consistant en une augmentation des taux de cellules phagocytaires dont le macrophage, qui secrètent des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et à l'azote (RNS), produisant ainsi les radicaux libres comme le  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  et le  $NOO^-$  et  $NO_x$ , respectivement<sup>[102]</sup>.

Pour lutter contre l'infection, le NADPH qui est un cofacteur d'oxydoréduction, est utilisé par le complexe enzymatique cytosolique NADPH oxydase afin de synthétiser de grandes biomolécules dont la  $NADP^+$ , le proton  $H^+$  ou encore la superoxyde ( $O_2^-$ ) qui s'associe avec d'autres molécules pour produire des radicaux libres; ainsi les cellules immunitaires utilisent le NADPH pour réduire le radical libre  $O_2^-$  et  $H_2O_2$  afin de dégrader la bactérie en cause<sup>[241]</sup>. L'astaxanthine (AST) est un caroténoïde nutritionnel qui est déjà connu pour ses

propriétés antioxydantes remarquables [162]. Cette étude vise à évaluer si le traitement des macrophages à l'AST *en ex-vivo* pourrait limiter la production des oxydants et donc les effets auto-oxydants qui y résultent, ceci est révélé en évaluant les taux du peroxyde d'hydrogène et du NO produits par le macrophage traité avec différentes concentrations d'AST chez des patients atteints de maladies carieuses et parodontales, comparés à ceux non traités dits contrôles. L'étude vise aussi tester l'activation des cellules phagocytaires macrophages et leur changement phénotypique relatif à leurs activités fonctionnelles. Ainsi, nous avons remarqué une diminution considérable de la production du NO chez les patients traités par l'AST, qui pourrait s'expliquer par le pouvoir de l'AST à réduire l'inflammation [171]. NO augmente de manière significative à la dose de 50  $\mu$ M ceci se traduit par l'augmentation de l'activité de l'enzyme inductible NO synthase NOS2 qui stimule les macrophages à sécréter les NO actives et tend vers un profil M2.

Par contre, une légère augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les patients atteints des deux maladies qui pourraient s'expliquer par le pouvoir de l'AST à stimuler le macrophage à inhiber son expression relativement qui tend vers l'anti-inflammation.

Des études récentes ont montré que l'astaxanthine à des doses précises pouvait augmenter l'activité respiratoire chez un modèle animal, infecté par la bactérie Gram négatif *Aeromonas hydrophila* [242].

D'autre part, d'autres travaux ont montré que des taux réduits du NO et de peroxyde d'hydrogène pourraient être le résultat d'une diminution des taux intracellulaires de molécules de signalisation redox [243], telles que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En revanche l'effet de l'astaxanthine a été clairement démontré antérieurement sur la régulation des oxydants et la réduction des ROS produit lors d'un processus tumoral au niveau de la prostate [171].

Contrairement aux résultats observés dans l'étude de Meng [171], ou le niveau du SOD a été diminué sous l'effet de l'AST contre les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres ; Au cours de notre étude, nous avons remarqué une activité enzymatique élevée de la superoxyde dismutase chez les sujets sains traités à différentes doses d'astaxanthine par rapport aux patients, mais toutefois la différence n'était pas significative.

La superoxyde dismutase constitue un système de défense de première intention lors de l'accumulation du ROS responsable de la prolifération cellulaire et les mutations génétiques [115]. [171].

D'autres études seront nécessaires pour établir le point de compensation de dose d'AST à minimiser les dommages engendrés par l'oxydation et à induire d'efficaces fonctions immunitaires à médiation redox, telles que la prolifération, l'adhésion et l'explosion oxydative.

### **Effet de l'astaxanthine sur l'activité de la catalase**

La catalase, est une enzyme anti-oxydante connue. Sa surexpression dans les mitochondries aide à protéger les cellules contre les lésions dues à l'effet des espèces réactives à l'oxygène ROS ; Et aussi, elle permet de contrer la toxicité des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, le déficit en catalase induit des lésions tissulaires provoquées par des agents pro-oxydants, et augmente les ROS mitochondriales [244]. La catalase a deux activités enzymatiques en fonction de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, à une concentration élevée, elle agit de manière catalytique, en éliminant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour former H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub> (réaction catalytique) ; D'autre part, à une faible concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en présence d'un donneur d'hydrogène, par exemple l'éthanol, le méthanol, le phénol et d'autres, la catalase agit de manière peroxydée en éliminant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais en oxydant son substrat (réaction peroxydase), tout en formant du H<sub>2</sub>O [121]. [245].

Les données actuelles indiquent que la catalase est un régulateur clé de l'inflammation et du phénotype des macrophages. L'inactivation de la catalase, amplifie le stress oxydatif et accélère l'infiltration de macrophages dans les tissus. Fait intéressant, le déficit en catalase a également pour effet d'améliorer l'activation classique des macrophages (M1) et donc l'inflammation, ainsi que l'activation alternative (M2) de ces derniers [97].

Les antioxydants, en particulier les caroténoïdes, jouent un rôle important dans la régulation du processus oxydatif, de par leurs puissants effets antioxydants. Ces dernières années, les intérêts de l'astaxanthine (AST ; 3,3'-dihydroxy-β-β'-carotène-4,4'-dione) se sont multipliés. L'AST est un type de caroténoïde, dont l'activité anti-oxydante est 100 fois supérieure à celle de la vitamine E. Il a été prouvé qu'une supplémentation d'AST diminue les activités de la superoxyde dismutase (SOD), et celle de la catalase (CAT) dans les lignées de cellules traitées avec du Cu<sup>2+</sup> dans le cas de lésions de la prostate [171].

Dans la présente étude, le traitement des macrophages par l'AST à partir de la dose de 10 μM a diminué l'activité de la catalase ; Ce qui se définit par le fait que l'AST a induit une réaction catalytique de la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène. En

même temps, cette baisse de l'enzyme catalase provoquerait l'augmentation du pouvoir oxydoréductase, favorisant ainsi l'activation du macrophage plutôt vers un profil anti-inflammatoire que pro-inflammatoire.

### **Effet de l'astaxanthine sur l'activité métabolique des macrophages (Ca<sup>2+</sup>, GLU, CHOL)**

La signalisation cellulaire par l'intermédiaire du calcium (Ca<sup>2+</sup>) est d'une importance primordiale pour le système immunitaire. Des augmentations de concentrations en Ca<sup>2+</sup> dans la cellule immunitaire contrôlent des fonctions complexes, telles que fonction métabolique, la prolifération et la différenciation cellulaires, la sécrétion de cytokines et d'anticorps ainsi que le contrôle de la cytotoxicité. Parallèlement, elle sert aussi de signal initiateur pour les macrophages quant à la modulation de l'inflammation<sup>[187]</sup> et sa polarisation vers le profil pro-inflammatoire M1<sup>[196]</sup>. En revanche, la modification de la régulation du Ca<sup>2+</sup> dans les Mφ conduit à divers syndromes auto-immuns voir inflammatoires <sup>[246]</sup>.

D'autre part, il a été rapporté que le stress oxydatif provoque un afflux de Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme à partir de l'environnement extracellulaire et du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique, par conséquent, l'augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme provoque une accumulation du calcium dans les mitochondries et les noyaux des mitochondries, qui sont les principales sources d'ATP. Cet afflux perturbe son métabolisme physiologique normal, conduisant ainsi à la mort cellulaire ou apoptose <sup>[247]</sup>.

Les mitochondries jouent un rôle important dans ces processus car elles sont la principale source d'ATP. L'absorption du Ca<sup>2+</sup> dans la mitochondrie est responsable de l'augmentation du déficit énergétique mais aussi du maintien de la capacité antioxydante dans un état réduit afin d'éviter une émission excessive des espèces réactives à l'oxygène (ERS ou ROS) <sup>[248]</sup>.

Il a été récemment constaté dans la littérature, que l'AST inhibait de manière significative la mort cellulaire induite par apoptose, stimulée par la surcharge en calcium dans le cytoplasme, en maintenant l'équilibre rédox et en inhibant l'afflux de calcium <sup>[249]</sup>.

Dans nos résultats obtenus, nous avons remarqué que la quantité de calcium, soit intra ou extra cellulaire mesurée dans nos cultures de macrophages supplémentés à l'AST a été significativement augmentée ceci est suivi par une diminution du taux du NO produit, ceci pourrait montrer que l'AST a pu empêcher les modifications oxydatives, le résultat concorde avec plusieurs études précédentes <sup>[178], [179], [250]</sup>.

Le recueil de nos résultats, montrent une augmentation accrue du taux de calcium chez les patients atteints de maladie carieuse et parodontale et traités par l'astaxanthine ; Ce fait pertinent se traduit par des situations immunopathologiques qui peuvent être expliquées par l'afflux de calcium intracellulaire induit entre autre par l'IFN $\gamma$  dont résulte l'activation des macrophages en un phénotype pro-inflammatoire M1 fonctionnel avec expression génique de molécules inflammatoires<sup>[196]</sup>.

L'un des principaux rôles du Ca<sup>2+</sup> ainsi que son origine régulent les fonctions immunitaires innées impliquant le phénotype d'activation du macrophage M1<sup>[100]</sup>.

D'autre part, l'activation phénotypique des M $\phi$ s dépend aussi de la composition de l'environnement dans lequel ils résident. il est bien reconnu que leur composition est un facteur déterminant dans son métabolisme et sa plasticité fonctionnelle <sup>[251]</sup>.

Par ailleurs, il est bien reconnu que la production d'ATP est nécessaire à la fonction des M $\phi$ , à la fois dans des conditions homéostatiques et sous stress<sup>[251]</sup>.

Le glucose est la principale source de la production d'ATP par deux voies directement liées, la voie dite cycle tricarboxylique mitochondrial également appelée cycle de Krebs qui est directement liée à la glycolyse, fait intéressant, la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 avec LPS s'accompagne d'une augmentation de l'absorption de glucose, un cycle de Krebs interrompu et d'une conversion accélérée en lactate <sup>[252], [253]</sup>.

D'autre part, d'autres études ont montré que le traitement par l'AST, pourrait constituer un nouveau traitement potentiel de l'inflammation en modifiant des paramètres métaboliques comme le glucose<sup>[254]</sup>.

Nos résultats concernant la supplémentation en AST pour les patients atteints des lésions carieuses et parodontales, ont montré une diminution significative du taux de glucose intra et extra cellulaire à la dose 1, qui pourrait s'expliquer par la consommation du glucose par le macrophage afin de changer de profil M1 ;Néanmoins, à notre connaissance, il n'y a pas de travaux similaires qui nous permettent de s'y référer et d'établir des comparaisons.

Cependant pour le taux de cholestérol, les M $\phi$ s en tant que cellules immunitaires interagissent avec un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui influent leur prolifération ainsi que leur différenciation ; Cependant, le phénotype dépend du micro environnement dans lequel il réside <sup>[277],[125]</sup>.

Lorsque la cellule accumule l'ester de cholestérol, le taux de cholestérol contenu dans les microdomaines devient mal régulé, ce déséquilibre provoque une activation prolongée des voies de signalisation des cellules immunitaires, ce rôle est assuré par les radeaux lipidiques des microdomaines dynamiques plasmiques <sup>[254]</sup>, d'autre part, le CHOL entraîne une polarisation vers un profil anti inflammatoire et la biosynthèse de lipides<sup>[277]</sup> .

En revanche, il a été clairement admis dans une étude que la supplémentation en astaxanthine pourrait modifier la voie du transport du cholestérol et l'accumulation de celle-ci en dans les macrophages et inhiber en même temps l'activité de l'athérosclérose <sup>[278]</sup> .

Dans la présente étude, nous avons remarqué une augmentation très intéressante du taux de CHOL ( $p < 0,0001$ ) qui se traduit par la modulation phénotypique en profil M1 de notre macrophage. Des principes similaires ont été impliqués dans d'autres contextes dans lesquels l'hypercholestérolémie est associée à l'activation de l'inflammasome<sup>[125]</sup>, nos résultats inciteraient les auteurs à d'autres futures investigations pour vérifier ce résultat avec d'autres maladies dentaires.

L'étude épidémiologique menée auprès de 515 élèves âgés de 12 à 15 ans de classe de cours moyens et secondaires, identifiés dans des UDS de la région de Tlemcen a révélé les principaux résultats suivants : classe moyenne  $13,3 \pm 0,93$  ans, sexe ratio 0,95 à 1,14, un taux de maladie carieuse de 73,9% , une fréquence de la maladie parodontale de 68,9%, les principaux facteurs de risque démontrés liés à la maladie carieuse sont la salive visqueuse et l'hygiène orale médiocre, et ceux liés à la maladie parodontale sont l'hygiène bucco dentaire ; Ces résultats montrent un aspect négatif de l'état buccodentaire de cette population.

Pour l'étude transversale analytique, nous avons effectué un tirage au sort stratifié pour le recrutement des patients, éliminant ainsi le biais de sélection, également nous avons un taux de refus de 0% ; Le diagnostic des affections dentaires étudiées a été fait à la base d'une exploration clinique minutieuse, un biais d'information est alors éliminé.

L'analyse des facteurs de risque a été faite par analyse stratifiée éliminant ainsi les biais de confusion.

Par ailleurs, dans l'expérimentation, nous avons utilisé des techniques standards avec une spécificité et sensibilité ( $Sp-Se-0,001$ ) (méthode ELISA), en plus de toutes les manipulations ont été faites par un seul manipulateur, éliminant ainsi un biais d'information.

Le recours à cette enquête transversale a permis de recruter un nombre important d'individus dans un laps de temps déterminé, par ailleurs, elle présente de nombreuses limites notamment le biais de prévarication et l'analyse du pouvoir tampon qui n'a pas pu être réalisée car la méthode de lecture au laboratoire s'avère compliquée et requiert une certaine spécificité dans le savoir faire et un laps de temps assez long.

Les prévalences de la lésion carieuse et parodontale sont respectivement 73,9% et 68,9%. Des bilans antérieurs datant de 2001 effectués par le Ministère de la santé et de la population en Algérie, concluent que la maladie carieuse est la pathologie la plus fréquente en milieu scolaire, un chiffre de 40% a été enregistré et semble être sous-évalué vue le manque de conditions optimales de dépistage.

De même les statistiques annoncées par la direction de la santé publique au cours d'un séminaire d'information et de formation tenu le 24/04/2005 à Tlemcen, estime une prévalence de 54,9% en milieu scolaire.

Vu le manque de données épidémiologiques actuelles fiables au niveau de la région de Tlemcen, nos résultats ont été comparés à des études menées au niveau d'autres villes avoisinantes. L'étude de l'épidémiologie des affections bucco-dentaires revue par Bassaid en 2013, indique que la maladie carieuse et parodontale semblent être fréquentes au niveau des deux sexes avec une prédominance masculine avec un taux de 68% d'enfants qui présentaient une dent permanente cariée et une fréquence de 35% de l'inflammation gingivale, chez les élèves appartenant à des classes socio économiques basses et demeurant la zone urbaine.

L'étude menée à Ain Temouchent qui a défini une prévalence de 76,1% , la comparaison a été faite avec d'autres pays africains telle que l'étude de Chala menée en 2012 au Maroc et qui a estimé une prévalence de la maladie carieuse de 86%<sup>[39]</sup>, une étude similaire a retrouvé un taux de 47,29% chez des adolescents en Inde<sup>[23]</sup>, une autre enquête identique transversale menée par Morena en 2015<sup>[7]</sup> estime une fréquence de 69,5% avec une distribution à part égale de la maladie carieuse entre les deux sexe, une prévalence de 68,4% à été notée au niveau de la région amazonienne <sup>[198]</sup> .

Les élèves de notre échantillon, quelque soit leur sexe, ayant un niveau socioéconomique bas et habitant la région rurale ont un risque plus élevé de développer les deux maladies avec une prédominance masculine au niveau de la maladie parodontale.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le manque de moyens financiers pour assurer le maintien de l'hygiène orale à long terme de plus, le coût élevé de la prise en charge et l'accès aux soins constitue un frein voire une barrière pesante, responsable de la répartition non homogène des deux maladies, il se trouve aussi que les filles soient plus motivées que les garçons, puisqu'elles accordent plus d'attention à leurs soins esthétiques à cet âge que les garçons.

L'hypothèse peut également être entendue par les différences socioculturelles fondées sur le fait que les parents soient moins instruits dans cette région et moins sensibilisés sur les mesures et pratiques de prévention orale.

A noter que les ressources médicales sont moins disponibles dans les régions rurales, partout dans le monde, des études viennent corroborer la relation entre les lésions carieuses de l'enfant et la classe sociale à laquelle il appartient.

Le comportement alimentaire des enfants a été analysé dans plusieurs études, dans une enquête menée en 2017 au Brésil, 686 enfants ont été examinés, il a été conclu que la prévalence de la carie dentaire chez cette population est significativement associée à la présence de la plaque, à une fréquence de brossage très faible et à une forte fréquence du grignotage chez les enfants en précolaire<sup>[199]</sup>.

Dans une autre étude en Chine, sur 4815 enfants enquêtés qui se brossent deux fois à plusieurs fois par jour, consommant également des collations entre repas et des boissons sucrées présentaient une prévalence importante (44 %) avec un indice CAO très bas (1,14)<sup>[200]</sup>, dans notre enquête, les enfants qui se brossent plus de trois fois par jour et ayant une alimentation sucrée et une fréquence importante de grignotage sont plus susceptibles de développer une maladie carieuse et parodontale, ce qui concorde avec les résultats précédents.

Ces résultats peuvent être en rapport avec l'absence du programme de sensibilisation sur la maladie carieuse, destiné aux élèves du niveau scolaire moyen et secondaire.

Cependant, les aliments ciblés sont représentés par des produits sucrés selon plusieurs études.

Les aliments sont définis comme cariogène si ceux-ci participent de façon directe ou indirecte à l'apparition de la maladie carieuse, provoquant la baisse du pH buccal. Ces

derniers varient en fonction de leurs constituants, de la quantité et du moment de la consommation ainsi que le terrain sur lequel ils agissent c'est-à-dire l'hôte.

Par ailleurs, pour les mesures d'hygiène, nos résultats révèlent une association significative avec la maladie carieuse et la maladie parodontale, corroborant celles effectuées par Holmes qui révèle dans son étude que le nombre de brossage  $< 2$  fois / jour entraînait une augmentation significative des lésions carieuses par rapport au brossage  $\geq 2$  / jour <sup>[201]</sup> ; Il existe relativement quelques d'études évaluant l'association entre la fréquence de brossage des dents et la parodontite. Un effet clair a été observé, indiquant que des brossages peu fréquents des dents étaient associés à des formes graves de maladie parodontale <sup>[202]</sup> .

L'accumulation de plaque est un signe d'une mauvaise hygiène orale, qui provoquerait la genèse de la lésion carieuse, en présence des autres facteurs et de l'inflammation gingivale, dans notre étude presque un tiers de la population présente un score de plaque non visible, ce résultat n'est pas significatif, contrairement à l'étude de Bessaid qui montre que  $\frac{3}{4}$  présente une présence de plaque abondante<sup>[34]</sup> .

Par ailleurs, le calcul de l'indice CAO moyen de l'ensemble de la population infantile enquêtée révèle une légère augmentation pour la tranche d'âge 12, 14 et 15 ans, et moyen pour la tranche d'âge de 13 ans.

Ces résultats sont similaires à ceux de Bessaid<sup>[34]</sup> et celle de Chala<sup>[39]</sup>, ceci est due au développement d'une alimentation plus riche en hydrate de carbone qui devient malheureusement très fréquente à cet âge là.

Cette étude est basée principalement sur l'analyse des paramètres salivaires, à partir de laquelle il a été démontré que le pH salivaire de la majorité des enfants présentant des lésions carieuses, varie de 6,5-7,5 alors que la littérature se réfère à un seuil critique de 5,5.

Nos résultats similaires à l'étude de Preethi <sup>[203]</sup> , montrent qu'il existe une association non significative [ $OR=0,52(0,26-1,04)$  ;  $p=0,06$ ] entre le pH et l'apparition de la maladie carieuse, à l'inverse, l'étude d'Animireddy<sup>[204]</sup> démontre une association significative ( $p < 0.001$ ).

En général, plus le débit salivaire augmente, plus la clairance est importante et plus la capacité tampon est élevée, ce qui s'oppose à l'attaque microbienne <sup>[205]</sup> , dans notre étude, un très grand nombre d'enfants présentant ou non des lésions carieuses évaluées présente un

débit salivaire supérieur à 5 ml, et sa relation avec la lésion carieuse n'est pas significative, de façon similaire à une étude menée en 2008 rapportant des valeurs identiques entre les deux groupes<sup>[206]</sup>.

En comparant ces résultats avec d'autres, l'étude de Prabhakar montre que le débit salivaire est élevé chez les enfants indemnes de lésions carieuses par rapport au groupe qui en présente<sup>[207]</sup>.

A contrario Birkhed, Heintze et Russel et al, ainsi que Tulungo rapportent qu'il n'existe pas de corrélation entre le flux salivaire et l'activité carieuse<sup>[208],[209]</sup>.

L'analyse de la viscosité salivaire dans notre présente étude révèle une association significative avec la maladie carieuse de manière identique à l'étude de Animireddy menée en 2014<sup>[204]</sup>.

D'un point de vue parodontal, les résultats ont montré qu'il existe une corrélation statistique significative entre le sexe et la maladie parodontale, puisque près de 75% de la population masculine est atteinte de cette lésion, contrairement à l'étude de Vered qui montre un pourcentage moindre due à la faible consommation de tabac connu comme un facteur de risque certain<sup>[210]</sup>.

Nos résultats ont montré une différence non significative entre la maladie parodontale et le pH salivaire contrairement à l'étude de Galgut ,qui a affirmé qu'il existe une relation significative principalement pour les parodontites<sup>[211]</sup>.

De même, pour le débit salivaire dont l'association avec la maladie parodontale n'est pas significative dans cette étude, contrairement l'étude de Rajesh et al qui évoque une association significative ( OR) <sup>[212]</sup>.

En revanche, La cavité orale est un écosystème biologique complexe, en équilibre précaire, en raison des modifications qui s'y produisent en permanence : variations du débit salivaire, prises alimentaires, modification du pH buccal, plaque dentaire, qui dépendent de l'âge et de l'individu.

La cavité buccale est ainsi régulièrement soumise à des agressions potentiellement pathogènes affectant l'hôte<sup>[12]</sup>.

Ce biotope est idéal pour une communauté bactérienne active qui, avec d'autres constituants du milieu buccal représente un environnement propice pour leur croissance. Différents facteurs agresseurs intrinsèques et extrinsèques surviennent suite à une déficience de l'hôte ou à une augmentation de l'agressivité du milieu, provoquant ainsi un déséquilibre de l'homéostasie et favorisent aussi l'apparition des lésions carieuses et parodontales.

En effet, la lésion carieuse est l'une des maladies chroniques et multifactorielles les plus courantes chez les enfants, due à la coexistence de trois facteurs principaux: les micro-organismes acidogènes et acidophiles, les glucides provenant de l'alimentation et les facteurs de l'hôte [1],[39],[41]. Les micro-organismes buccaux forment une plaque dentaire à la surface des dents, présentant les caractéristiques du biofilm classique. La formation de biofilms semble être influencée par les changements à grande échelle dans l'expression des protéines au fil du temps et sous contrôle génétique. A leur tour, les micro-organismes cariogènes produisent des acides lactiques, formiques, acétiques et propioniques qui sont des produits du métabolisme des glucides. Leur présence entraîne une diminution du pH à un degré inférieur à 5,5, impliquant la déminéralisation des cristaux d'hydroxyapatite de l'émail et la dégradation protéolytique de la structure des tissus durs des dents par les métalloprotéinases matricielles présentes et activées dans la dentine ou la salive<sup>[213]</sup>.

D'autre part, la maladie parodontale est définie comme une maladie inflammatoire complexe multiphasique des tissus de soutien des dents, provoquée par des micro-organismes spécifiques, engageant la destruction progressive du ligament parodontal et de l'os alvéolaire avec la formation de poches parodontales, récession gingivale ou les deux à la fois ; c'est aussi le résultat d'un déséquilibre entre l'agent microbien et la réponse immunitaire de l'hôte.

La colonisation de l'épithélium gingival et l'invasion des tissus sous-jacents par les bactéries de la plaque peuvent conduire à une réponse inflammatoire locale responsable de la destruction tissulaire<sup>[214]</sup>. Les bactéries et plus précisément certains de leurs constituants, dont les lipopolysaccharides (LPS), peuvent déclencher la réaction inflammatoire en activant directement les cellules épithéliales gingivales et des cellules leucocytaires du réseau immunitaire inné comme les macrophages<sup>[145]</sup>, cette activation induit la synthèse de médiateurs de l'inflammation, en particulier les interleukines 6 et 8 <sup>[211]</sup>. Ces dernières stimulent les cellules sous-jacentes, fibroblastes, cellules endothéliales, monocytes,

neutrophiles et lymphocytes B et T ainsi que les macrophages qui, à leur tour, synthétisent leurs propres médiateurs inflammatoires <sup>[215]</sup> .

C'est ainsi qu'au niveau des deux lésions citées ci-dessus, le développement du biofilm oral est soumis à divers facteurs environnementaux et gouverné par la réponse immunitaire de l'hôte suite à une colonisation bactérienne<sup>[216]</sup>. En particulier ceux présents dans les fluides buccaux, salivaires et gingivaux, situés dans les tissus durs comme la dentine, ou encore le tissu conjonctif chorion gingival ou la pulpe, libérant des endopeptides métalloprotéinases matricielles<sup>[12]</sup>. Ces endopeptides sont très multiples et variés ; par ailleurs, il a été rapporté dans la littérature que les collagénases se trouvent aussi bien dans la dentine que dans le parodonte et peuvent être secrétées par le macrophage en réponse à une agression bactérienne<sup>[140],[146],[147],[217],[219]</sup>.

# **Chapitre 5**

# **Conclusion**

## Conclusion et recommandations

D'un point de vue expérimental, compte tenu des limites de cette étude, nous n'avons pu ni réaliser ni approfondir l'analyse du pouvoir tampon salivaire.

Cependant, l'astaxanthine, molécule bioactive qui se distingue des autres molécules en ce qui concerne ses applications thérapeutiques ainsi que son mécanisme d'action, montre des propriétés intéressantes concernant le pouvoir de moduler la réponse immunitaire et l'immunométabolisme et d'induire la polarisation des phénotypes M1/M2 des Mφs.

Cette étude, soutient l'hypothèse que l'astaxanthine pourrait jouer un rôle remarquable dans la modulation des activités fonctionnelles globales des macrophages humains activés et stimulés par le LPS. En résumé, l'effet de l'astaxanthine peut induire la génération Mφs M2.

Les résultats de nos observations expérimentales sur l'inhibition du pouvoir enzymatique des métalloprotéinases impliquées dans les deux lésions carieuses et parodontales, corroborent notre approche selon laquelle, parmi les quatre doses de l'astaxanthine, la dose 10 μM, semblerait la plus appropriée pour prévenir à la fois les activités MMP-9 et MMP-13, il semble concevable que l'AST pourrait s'avérer utile à des fins thérapeutiques et/ou préventives.

Concernant notre étude épidémiologique, au terme de ce travail, nous estimons que cette étude est parmi les premières à évaluer, sur un grand nombre d'enfants scolarisés de la région de Tlemcen, la prévalence des maladies carieuses et parodontales et à apprécier les facteurs impliqués dans la genèse de ces dernières.

Dans l'optique d'une prise de conscience, nous avons ainsi constaté la grande prévalence de la maladie carieuse et de la maladie parodontale dans la population étudiée.

Un bas niveau socio-économique, une hygiène orale insuffisante et une alimentation riche en glucides apparaissent comme étant les principaux facteurs de risque dans l'apparition de ces pathologies.

Enfin, l'évaluation et la surveillance épidémiologique systématique restent de mise chez les enfants.

Vue la fréquence assez élevée de ces deux pathologies, on doit agir par un programme d'information, d'éducation, et de sensibilisation vis-à-vis de cette jeune population.

Ce programme porterait sur les habitudes alimentaires, l'hygiène de vie et notamment l'apprentissage d'une bonne technique de brossage dentaire.

Il serait significatif d'élargir la zone géographique à étudier, en recrutant un nombre beaucoup plus significatif d'échantillons afin d'avoir une répartition homogène entre le milieu rural et urbain et pouvoir effectuer la comparaison statistique.

Plusieurs études épidémiologiques de ce genre s'avèrent nécessaires et mériteraient d'être encouragées, nous espérons donner de l'impulsion à la recherche locale et régionale dans cet axe au niveau des écoles fondamentales, l'approche de la tranche d'âge entre 5 et 7ans semble aussi très intéressante à étudier.

La carie dentaire et la maladie parodontale restent un problème de santé majeur chez les enfants au niveau du monde entier.

Il y a un grand besoin d'accroître la promotion de la santé bucco-dentaire, de l'éducation et de la prévention comme moyens réductifs des atteintes bucco-dentaires chez cette population.

### **Perspectives et Recommandations**

Les résultats obtenus lors de notre approche expérimentale mettent en exergue l'importance et le rôle des différentes enzymes dans les pathologies étudiées.

Néanmoins, il reste évident que des recherches supplémentaires seront encore nécessaires pour élargir la base de connaissances relatives à cette classe d'enzymes ou d'autres impliquées dans les lésions dentaires.

Dans ce contexte, nous proposons :

- \* La mise en oeuvre d'un essai thérapeutique sur cette population et voir l'effet *in vivo* chez les patients atteints des deux pathologies.

- \* Une approche approfondie sur le pouvoir tampon salivaire afin d'explorer ce paramètre fondamental et d'en déduire son impact sur la maladie carieuse.

Il nous semble intéressant de déterminer le niveau de son lien avec les atteintes carieuses et parodontales.

\* L'utilisation d'un versus d'une molécule naturelle pour inhiber le mécanisme pathologique dans les mêmes conditions.

\* La création d'une association *Astaxanthine / Molécule chimique bioactive* qui pourrait optimiser l'effet anti inflammatoire de l'astaxanthine.

\* L'élargissement de la panoplie des marqueurs biologiques secretés par les macrophages tels que les cytokines ainsi que leurs activités fonctionnelles, telle que la phagocytose et de la capacité destructrice des bactéries qui renforceraient nos conclusions sur la polarisation cellulaire du macrophage en ex-vivo.

Notre étude épidémiologique fait ressortir une fréquence élevée des deux pathologies carieuses et parodontales.

Ceci, nous a incité à élaborer un programme d'éducation sanitaire destiné aux enfants scolarisés, renfermant une éducation thérapeutique sur l'hygiène buccale, alimentaire et aussi sur des mesures préventives qui devront être entreprises au niveau des écoles.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## Références bibliographiques

- [1] R. H. Selwitz, A. I. Ismail, et N. B. Pitts, « Dental caries », *Lancet*, vol. 369, n° 9555, p. 51-59, janv. 2007.
- [2] A. I. Ismail, H. Hasson, et W. Sohn, « Dental caries in the second millennium », *J Dent Educ*, vol. 65, n° 10, p. 953-959, oct. 2001.
- [3] P. W. Caufield et A. L. Griffen, « Dental caries. An infectious and transmissible disease », *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 47, n° 5, p. 1001-1019, v, oct. 2000.
- [4] P. D. Marsh, « The role of microbiology in models of dental caries », *Adv. Dent. Res.*, vol. 9, n° 3, p. 244-254; discussion 255-269, nov. 1995.
- [5] W. Loesche, « Dental caries and periodontitis: contrasting two infections that have medical implications », *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 21, n° 2, p. 471-502, vii, juin 2007.
- [6] S. M. Elidrissi et S. Naidoo, « Prevalence of dental caries and toothbrushing habits among preschool children in Khartoum State, Sudan », *Int Dent J*, vol. 66, n° 4, p. 215-220, août 2016.
- [7] N. Molina-Frechero, D. Durán-Merino, E. Castañeda-Castaneira, et M. L. A. Juárez-López, « [Dental caries experience and its relation to oral hygiene in Mexican children] », *Gac Med Mex*, vol. 151, n° 4, p. 485-490, août 2015.
- [8] X.-S. Zhang *et al.*, « Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase-9 expression and activity in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage in rats », *Brain Research*, vol. 1624, p. 113-124, oct. 2015.
- [9] A. Kamagate, N. T. Coulibaly, D. Kone, E. Brou, et L. R. Bakayoko, « [The prevalence of periodontal disease. Periodontal disease in black Africa. The impact of socioeconomic factors and cultural customs] », *Odontostomatol Trop*, vol. 24, n° 94, p. 37-41, juin 2001.
- [10] A. Lips *et al.*, « Salivary protein polymorphisms and risk of dental caries: a systematic review », *Braz Oral Res*, vol. 31, p. e41, juin 2017.
- [11] S. S. Garcia *et al.*, « Targeting of Streptococcus mutans Biofilms by a Novel Small Molecule Prevents Dental Caries and Preserves the Oral Microbiome », *J. Dent. Res.*, vol. 96, n° 7, p. 807-814, juill. 2017.
- [12] J.-J. Lasfargues, P. Colon, G. Vanherle, et P. Lambrechts, *Odontologie conservatrice et restauratrice. Tome 1, Tome 1.*, Paris: Éditions CdP, 2009.
- [13] F. F. Mohammed, D. S. Smookler, et R. Khokha, « Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 62 Suppl 2, p. ii43-47, nov. 2003.
- [14] A. Dallagi *et al.*, « The activating effect of IFN- $\gamma$  on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation », *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 12, n° 3, p. 326-341, mai 2015.
- [15] K. Wang, W. Zhou, Q. Cai, J. Cheng, R. Cai, et R. Xing, « SUMOylation of KLF4 promotes IL-4 induced macrophage M2 polarization », *Cell Cycle*, vol. 16, n° 4, p. 374-381, févr. 2017.
- [16] Morel E, « La maladie carieuse: aspect épidémiologique », 2012.
- [17] Goetz P, « phytothérapie des caries et abcès dentaires », p. 72-74, 2017.
- [18] « Étiologie et Prévention de la Carie Dentaire. Rapport d'un groupe de scientifiques de l'OMS. Série de rapports techniques », *Organisation Mondiale de la Santé, Geneve*, p. 5-14., 1972.
- [19] *Oral health surveys, Basic methods*, 4th. ed. Geneva: WHO, 1997.

- [20] A. Julihn, F. C. Soares, A. Hjern, et G. Dahllöf, « Socioeconomic Determinants, Maternal Health, and Caries in Young Children », *JDR Clin Trans Res*, vol. 3, n° 4, p. 395-404, oct. 2018.
- [21] O. Urquhart *et al.*, « Nonrestorative Treatments for Caries: Systematic Review and Network Meta-analysis », *J. Dent. Res.*, p. 22034518800014, oct. 2018.
- [22] M. Masood, G. Mnatzaganian, et S. R. Baker, « Inequalities in dental caries in children within the UK: Have there been changes over time? », *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, oct. 2018.
- [23] V. K Chugh, K. K Sahu, et A. Chugh, « Prevalence and Risk Factors for Dental Caries among Preschool Children: A Cross-sectional Study in Eastern India », *Int J Clin Pediatr Dent*, vol. 11, n° 3, p. 238-243, juin 2018.
- [24] P. J. Perera, N. T. Abeyweera, M. P. Fernando, T. D. Warnakulasuriya, et N. Ranathunga, « Prevalence of dental caries among a cohort of preschool children living in Gampaha district, Sri Lanka: A descriptive cross sectional study », *BMC Oral Health*, vol. 12, n° 1, déc. 2012.
- [25] C. Yuan *et al.*, « Oral Health Status of 12-year-olds from Regions with and without Coverage of the National Oral Health Comprehensive Intervention Program for Children in China », *Chin J Dent Res*, vol. 21, n° 4, p. 299-306, 2018.
- [26] I. Mota-Veloso, M. L. Ramos-Jorge, M. A. Homem, I. A. Pordeus, S. M. Paiva, et F. Oliveira-Ferreira, « Dental caries in schoolchildren: influence of inattention, hyperactivity and executive functions », *Braz Oral Res*, vol. 32, p. e52, juin 2018.
- [27] E. Fleming et J. Afful, « Prevalence of Total and Untreated Dental Caries Among Youth: United States, 2015-2016 », *NCHS Data Brief*, n° 307, p. 1-8, avr. 2018.
- [28] S. Chala, K. Silorh, R. Abouqal, et F. Abdallaoui, « [Factors associated with dental care use among a population of Moroccan adolescents] », *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale*, vol. 117, n° 6, p. 367-371, déc. 2016.
- [29] A. Abid *et al.*, « Prevalence and Severity of Oral Diseases in the Africa and Middle East Region », *Adv. Dent. Res.*, vol. 27, n° 1, p. 10-17, juill. 2015.
- [30] Bouziane Mohamed, « La santé bucco dentaire de la population scolarisée de 6 à 25 ans dans l'ouest algerien », Oran, 1979.
- [31] Djellal Benkaaloul, « contribution à la prophylaxie des lésions carieuses et des lésions gingivales chez l'enfant en âge préscolaire », Oran, 1987.
- [32] cherifi A, « Enquête épidémiologique sur l'état bucco-dentaire des enfants scolarisés de 6, 9 et 12 ans dans la wilaya de Annaba », BADJI Mokhtar, Annaba, 2014.
- [33] fatima zohra Benaissa, « La santé bucco dentaire en milieu scolaire dans la wilaya de Sidi Bel abbes : Etude épidémiologique et perspective », Université Djilali liabes, Sidi Bel abbes, 2011.
- [34] Bessaid. A, Bendimerad. N, Mesli. M.F, « LES AFFECTIONS BUCCO-DENTAIRES CHEZ L'ADOLESCENT SCOLARISE DE 12 A 15 ANS A ARZEW (WILAYA D'ORAN) DURANT L'ANNÉE 2012 », *Journal d'épidémiologie et de Santé Publique*, Oran, p. 3-14, mars-2015.
- [35] Benali S, Laoussati M, BendimradN, « LA CARIE DENTAIRE ET LES FACTEURS ASSOCIÉS CHEZ LES ENFANTS EN BAS AGE A AIN TEMOUCHENT EN 2013 », *Journal d'Epidémiologie et de Santé Publique*, Oran, p. 35-44, mars-2014.
- [36] D. Bourgeois, M. Benabdelhafid, et G. Perdrix, « Prevalence of dental decay and treatment needs in Algerian schoolchildren and adolescents in the Constantine area », *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, vol. 19, n° 4, p. 239-239, août 1991.
- [37] Oulhaci Jalal, « Approche contributive à l'évaluation du risque carieux individuel chez 700 enfants âgés de 7 et 13 ans de la ville d'Oran », Oran, 2016.

- [38] M. Naidoo et S. Singh, « The Oral health status of children with autism Spectrum disorder in KwaZulu-Nata, South Africa », *BMC Oral Health*, vol. 18, n° 1, p. 165, oct. 2018.
- [39] S. Chala, K. Silorh, R. Abouqal, et F. Abdallaoui, « [Factors associated with dental care use among a population of Moroccan adolescents] », *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale*, vol. 117, n° 6, p. 367-371, déc. 2016.
- [40] P. Farge, « [Recent findings in the etiopathogenesis of caries] », *Arch Pediatr*, vol. 5, n° 10, p. 1140-1144, oct. 1998.
- [41] J. D. Featherstone, « The science and practice of caries prevention », *J Am Dent Assoc*, vol. 131, n° 7, p. 887-899, juill. 2000.
- [42] P. D. V. de Almeida, A. M. T. Grégio, M. A. N. Machado, A. A. S. de Lima, et L. R. Azevedo, « Saliva composition and functions: a comprehensive review », *J Contemp Dent Pract*, vol. 9, n° 3, p. 72-80, mars 2008.
- [43] S. Dubey, S. Saha, A. Tripathi, P. Bhattacharya, K. Dhinsa, et D. Arora, « A comparative evaluation of dental caries status and salivary properties of children aged 5–14 years undergoing treatment for acute lymphoblastic leukemia, type I diabetes mellitus, and asthma – In vivo », *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, vol. 36, n° 3, p. 283, 2018.
- [44] M. Maciejczyk, A. Pietrzykowska, A. Zalewska, M. Knaś, et I. Daniszewska, « The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases », *Adv Clin Exp Med*, vol. 25, n° 2, p. 383-390, avr. 2016.
- [45] M. Okamoto, Y. Takahashi, S. Komichi, P. R. Cooper, et M. Hayashi, « Dentinogenic effects of extracted dentin matrix components digested with matrix metalloproteinases », *Sci Rep*, vol. 8, n° 1, p. 10690, juill. 2018.
- [46] G. G. Nicolas et M. C. Lavoie, « [Streptococcus mutans and oral streptococci in dental plaque] », *Can. J. Microbiol.*, vol. 57, n° 1, p. 1-20, janv. 2011.
- [47] S. D. Forssten, M. Björklund, et A. C. Ouwehand, « Streptococcus mutans, Caries and Simulation Models », *Nutrients*, vol. 2, n° 3, p. 290-298, mars 2010.
- [48] P. D. Marsh, « In Sickness and in Health-What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective », *Adv. Dent. Res.*, vol. 29, n° 1, p. 60-65, 2018.
- [49] A. Barbour, R. Y. He, S.-G. Gong, et C. M. Lévesque, « Complete Genome Sequence of Streptococcus mutans Strain LAB761, Which Harbors Several Bacteriocin Loci, Isolated from a Caries-Active Child in Canada », *Microbiol Resour Announc*, vol. 8, n° 2, janv. 2019.
- [50] A. A. Baghban et L. Mehrdad, « To the editor: probiotic Lactobacillus paracasei effect on cariogenic bacterial flora », *Clinical Oral Investigations*, vol. 16, n° 5, p. 1513-1513, oct. 2012.
- [51] A. Simón-Soro et A. Mira, « Solving the etiology of dental caries », *Trends Microbiol.*, vol. 23, n° 2, p. 76-82, févr. 2015.
- [52] G. Gustafson, E. Stelling, et E. Brunius, « DIETARY CALCIUM AND CARIES. EXPERIMENTAL DENTAL CARIES IN GOLDEN HAMSTER. XII », *Acta Odontol. Scand.*, vol. 22, p. 477-485, oct. 1964.
- [53] L. Stösser, S. Kneist, et W. Grosser, « The effects of non-fluoridated and fluoridated milk on experimental caries in rats », *Adv. Dent. Res.*, vol. 9, n° 2, p. 122-124, juill. 1995.
- [54] J. Thompson, C. R. Gentry-Weeks, N. Y. Nguyen, J. E. Folk, et S. A. Robrish, « Purification from Fusobacterium mortiferum ATCC 25557 of a 6-phosphoryl-O-alpha-D-glucopyranosyl:6-phosphoglucohydrolase that hydrolyzes maltose 6-phosphate and related phospho-alpha-D-glucosides », *J. Bacteriol.*, vol. 177, n° 9, p. 2505-2512, mai 1995.

- [55] C. van Loveren, « [Preventive dentistry 8. Diet and caries] », *Ned Tijdschr Tandheelkd*, vol. 124, n° 10, p. 493-499, oct. 2017.
- [56] Anceaux C, 2011.
- [57] W. H. Bowen, « Dental caries - not just holes in teeth! A perspective », *Mol Oral Microbiol*, vol. 31, n° 3, p. 228-233, 2016.
- [58] O. Y. Yu, I. S. Zhao, M. L. Mei, E. C.-M. Lo, et C.-H. Chu, « Dental Biofilm and Laboratory Microbial Culture Models for Cariology Research », *Dent J (Basel)*, vol. 5, n° 2, juin 2017.
- [59] J. M. Ten Cate, « Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future », *J. Dent. Res.*, vol. 91, n° 9, p. 813-815, sept. 2012.
- [60] M. Sharma, M. D. Carson, J. Y. Graham, L. Y. Nelson, S. Patel, et J. Eric Seibel, « Dental pH Opti-Wand (DpOW): measuring oral acidity to guide enamel preservation », *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, vol. 2018, p. 3738-3741, juill. 2018.
- [61] J. Hicks, F. Garcia-Godoy, et C. Flaitz, « Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1) », *J Clin Pediatr Dent*, vol. 28, n° 1, p. 47-52, 2003.
- [62] X. Li, J. Wang, A. Joiner, et J. Chang, « The remineralisation of enamel: a review of the literature », *Journal of Dentistry*, vol. 42, p. S12-S20, juin 2014.
- [63] « Etiopathogénie des maladies parodontales », p. 1-9, 2015.
- [64] Bouchard P, « parodontologie et dentisterie implantaire volume 1; medecine parodontale », 2015.
- [65] A. R. Elias-Boneta, K. Ramirez, S. Rivas-Tumanyan, M. Murillo, et M. J. Toro, « Prevalence of gingivitis and calculus in 12-year-old Puerto Ricans: a cross-sectional study », *BMC Oral Health*, vol. 18, n° 1, p. 13, 19 2018.
- [66] Charon Jaques, « parodontie medicale, innovations cliniques », 2010.
- [67] « maladies gingivales induites par la plaque », *Encyclopédie médico chirurgicale*, p. 1-14, 2008.
- [68] « Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. », *Clinical periodontology*, p. Clin Periodonto, 1982.
- [69] V. Checchi et G. Pascolo, « Microbiological Response to Periodontal Therapy: A Retrospective Study », *Open Dent J*, vol. 12, p. 837-845, 2018.
- [70] J. Slots, « Periodontitis: facts, fallacies and the future », *Periodontol. 2000*, vol. 75, n° 1, p. 7-23, 2017.
- [71] « Distribution of Capnocytophaga in periodontal microfloras », *Periodont Res*, p. : 475-48, 1885.
- [72] KORNMAN KS, WE H, « The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. », *Periodontol 2000*, p. 83-97, 1993.
- [73] GEMMELL E, YAMAZAKI K, KJELDSSEN M, SEYMOUR G, « Immunology of periodontal diseases. », *Mucos Immuno! Update (summer)*, p. 4-15, 1995.
- [74] C. Funieru, A. Klinger, C. Băicuș, E. Funieru, H. T. Dumitriu, et A. Dumitriu, « Epidemiology of gingivitis in schoolchildren in Bucharest, Romania: a cross-sectional study », *J. Periodont. Res.*, vol. 52, n° 2, p. 225-232, avr. 2017.
- [75] S. M. Lorenzo-Erro, F. Massa, R. Álvarez-Vaz, H. S. Schuch, M. B. Correa, et M. A. Peres, « The role of contextual and individual factors on periodontal disease in Uruguayan adults », *Braz Oral Res*, vol. 32, p. e62, juill. 2018.
- [76] A. A. Akinkugbe, A. E. Sanders, J. S. Preisser, J. Cai, C. R. Salazar, et J. D. Beck, « Environmental tobacco smoke exposure and periodontitis prevalence among nonsmokers in the hispanic community Health Study/Study of Latinos », *Community Dent Oral Epidemiol*, vol. 45, n° 2, p. 168-177, 2017.

- [77] A. De, R. Puttannavar, F. Rahman, A. Adak, R. Sahoo, et B. S. R. Prakash, « Estimation of salivary and serum alkaline phosphatase level as a diagnostic marker in type-2 diabetes mellitus with periodontal health and disease: A clinico-biochemical study », *J Oral Maxillofac Pathol*, vol. 22, n° 3, p. 445, déc. 2018.
- [78] Michel Goldberg, Jean-Luc Ardouin, Yann Barrandon, Jean-Pierre Bernimoulin, Martine Bonnaure-Mallet, Jean-Pierre Bouvet, Monique Brion, et Guy Daculsi, Michael Dard, Dominique Kaiserlian, et al., *Maladies parodontales : thérapeutiques et prévention*, [Rapport de recherche] Institut national de la santé et de La recherche médicale(INSERM). .
- [79] Wolf HF., Rateitschak KH, « Parodontologie », p. 132-133 et 215. 2.
- [80] ANAES., « Parodontopathies: diagnostic et traitements. », 2002.
- [81] Haffeejee, Socransky SS, « The bacterial etiology of destructive periodontal disease current concepts. », *Journal clinical of Periodontology.*, p. 322-327, 1992.
- [82] LUNDQVIST C, BARANOV V, TEGLUND S, HAMMARSTROM S, HAMMARSTROM ML., « Cytokine profile and ultrastructure of intraepithelial yB T cells in chronically inflamed human gingiva suggest a cytotoxic effector function. ] », p. 2302-2312, 1994.
- [83] Preiss DS., Meyle J., « Interleukin-1 b concentration of gingival crevicular fluid », *Journal of Periodontology*, 1994.
- [84] Offenbacher, Soskolne WA., Coluns JG., « Prostaglandins and other eicosanoids in gingival cervicular fluid as markers of periodontal disease suseptibility and activity. », Cambridge University, p. 313-337, Vol-1991.
- [85] Émilie GUIRAUD, « MALADIES PARODONTALES ET DIABÈTE Enquête observationnelle SMIL' Bucco-Diabète », UNIVERSITÉ PAUL SABATIER - TOULOUSE III, 2013.
- [86] H. F. Wolf, K. H. Rateitschak, et E. M. Rateitschak, « [Periodontology. 2. Periodontitis in juvenile diabetes (a case report)] », *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, vol. 97, n° 10, p. 1291-1296, 1987.
- [87] « combination of metformin with sodium selenite induces a functional phenotypic switch of human GM-CSF monocyte-derived macrophages », *Internaional Immunopharmacology*, p. 212-224, 04-mai-2019.
- [88] M. Aribi, W. Meziane, S. Habi, Y. Boulatika, H. Marchandin, et J.-L. Aymeric, « Macrophage Bactericidal Activities against Staphylococcus aureus Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 9, p. e0135515, 2015.
- [89] MoghaddemS Vazini, H Taghadosi Esmaeilli M, « Macrophage plasticity polarization and function in health and disease: macrophages in health and disease », *journal of cellular physiology*, 2018.
- [90] J. Meyle, H. Dommisch, S. Groeger, R. A. Giacaman, M. Costalonga, et M. Herzberg, « The innate host response in caries and periodontitis », *J. Clin. Periodontol.*, vol. 44, n° 12, p. 1215-1225, déc. 2017.
- [91] E. T. Richardson *et al.*, « ERK Signaling Is Essential for Macrophage Development », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 10, p. e0140064, 2015.
- [92] Abul K.Abbas, Andrew H.Lichman, « les bases de l'immunologie fondamentale et Clinique », 2009.
- [93] S. M. Opal et V. A. DePalo, « Anti-Inflammatory Cytokines », *Chest*, vol. 117, n° 4, p. 1162-1172, avr. 2000.
- [94] S. R. Holdsworth et P.-Y. Gan, « Cytokines: Names and Numbers You Should Care About », *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 10, n° 12, p. 2243-2254, déc. 2015.

- [95] Z. Tang *et al.*, « Peripheral proinflammatory cytokines in Chinese patients with generalised anxiety disorder », *J Affect Disord*, vol. 225, p. 593-598, 01 2018.
- [96] M. Benoit, B. Desnues, et J.-L. Mege, « Macrophage Polarization in Bacterial Infections », *The Journal of Immunology*, vol. 181, n° 6, p. 3733-3739, sept. 2008.
- [97] Y. S. Park, M. J. Uddin, L. Piao, I. Hwang, J. H. Lee, et H. Ha, « Novel Role of Endogenous Catalase in Macrophage Polarization in Adipose Tissue », *Mediators Inflamm.*, vol. 2016, p. 8675905, 2016.
- [98] F. O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, et M. Locati, « Macrophage activation and polarization », *Front. Biosci.*, vol. 13, p. 453-461, janv. 2008.
- [99] T. A. Wynn et K. M. Vannella, « Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis », *Immunity*, vol. 44, n° 3, p. 450-462, mars 2016.
- [100] S. Gordon et F. O. Martinez, « Alternative activation of macrophages: mechanism and functions », *Immunity*, vol. 32, n° 5, p. 593-604, mai 2010.
- [101] Y. Emre, C. Hurtaud, T. Nübel, F. Criscuolo, D. Ricquier, et A.-M. Cassard-Doulcier, « Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages », *Biochem. J.*, vol. 402, n° 2, p. 271-278, mars 2007.
- [102] L. Ung, U. Pattamatta, N. Carnt, J. L. Wilkinson-Berka, G. Liew, et A. J. R. White, « Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease », *Clin. Sci.*, vol. 131, n° 24, p. 2865-2883, déc. 2017.
- [103] S. H. Kim et H. Kim, « Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review », *Nutrients*, vol. 10, n° 9, août 2018.
- [104] Kamila KACIMI, « Effet du sélénium et de la metformine sur la polarisation du macrophage », Tlemcen, 2016.
- [105] Meziane Warda, « Infection à SARM ET NOx », Université de Tlemcen- Abou-Bekr Belkaid, biologie, 2011.
- [106] M. Rath, I. Müller, P. Kropf, E. I. Closs, et M. Munder, « Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages », *Front Immunol*, vol. 5, p. 532, 2014.
- [107] R. F. Furchgott et J. V. Zawadzki, « The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine », *Nature*, vol. 288, n° 5789, p. 373-376, nov. 1980.
- [108] B. Mahut, B. Louis, et C. Delclaux, « [Measurement of exhaled nitric oxide: methodology] », *Rev Mal Respir*, vol. 23, n° 3 Suppl, p. 6S29-26S36, juin 2006.
- [109] J. W. Coleman, « Nitric oxide in immunity and inflammation », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 1, n° 8, p. 1397-1406, août 2001.
- [110] J. Alexandre *et al.*, « Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo », *Int. J. Cancer*, vol. 119, n° 1, p. 41-48, juill. 2006.
- [111] J. Foreman *et al.*, « Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth », *Nature*, vol. 422, n° 6930, p. 442-446, mars 2003.
- [112] R. S. Balaban, S. Nemoto, et T. Finkel, « Mitochondria, oxidants, and aging », *Cell*, vol. 120, n° 4, p. 483-495, févr. 2005.
- [113] L. A. Sena et N. S. Chandel, « Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species », *Mol. Cell*, vol. 48, n° 2, p. 158-167, oct. 2012.
- [114] Y. Wang, R. Branicky, A. Noë, et S. Hekimi, « Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling », *The Journal of Cell Biology*, vol. 217, n° 6, p. 1915-1928, juin 2018.
- [115] R. G. Alscher, N. Erturk, et L. S. Heath, « Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants », *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, n° 372, p. 1331-1341, mai 2002.

- [116] R. Docampo et S. N. J. Moreno, « Biochemistry of *Trypanosoma cruzi* », in *American Trypanosomiasis*, Elsevier, 2010, p. 365-392.
- [117] T. Fukai et M. Ushio-Fukai, « Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases », *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 15, n° 6, p. 1583-1606, sept. 2011.
- [118] H. Younus, « Therapeutic potentials of superoxide dismutase », *Int J Health Sci (Qassim)*, vol. 12, n° 3, p. 88-93, juin 2018.
- [119] E. J. Lee *et al.*, « Arginase II inhibited lipopolysaccharide-induced cell death by regulation of iNOS and Bcl-2 family proteins in macrophages », *Mol. Cells*, vol. 35, n° 5, p. 396-401, mai 2013.
- [120] T. Iwase *et al.*, « A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach », *Scientific Reports*, vol. 3, n° 1, déc. 2013.
- [121] D. Scibior et H. Czechtot, « [Catalase: structure, properties, functions] », *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, vol. 60, p. 170-180, 2006.
- [122] S. Goswami et P. Sharma, « Genetic biomarker for cancer immunotherapy », *Science*, vol. 357, n° 6349, p. 358, 28 2017.
- [123] X. Zhou *et al.*, « Syncytium calcium signaling and macrophage function in the heart », *Cell Biosci*, vol. 8, p. 24, 2018.
- [124] U. Klueh, C. Czajkowski, I. Ludzinska, Y. Qiao, J. Frailey, et D. L. Kreutzer, « Impact of CCL2 and CCR2 chemokine/receptor deficiencies on macrophage recruitment and continuous glucose monitoring in vivo », *Biosens Bioelectron*, vol. 86, p. 262-269, déc. 2016.
- [125] A. R. Tall et L. Yvan-Charvet, « Cholesterol, inflammation and innate immunity », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, n° 2, p. 104-116, févr. 2015.
- [126] T. Køllgaard *et al.*, « Cholesterol crystals enhance TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory cytokine responses of monocytes to the proatherogenic oral bacterium *Porphyromonas gingivalis* », *PLoS ONE*, vol. 12, n° 2, p. e0172773, 2017.
- [127] A. Ghasemi *et al.*, « New modified Friedewald formulae for estimating low-density lipoprotein cholesterol according to triglyceride levels: extraction and validation », *Endocrine*, vol. 62, n° 2, p. 404-411, nov. 2018.
- [128] L. Yadav, N. Puri, V. Rastogi, P. Satpute, R. Ahmad, et G. Kaur, « Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy », *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 15, n° 3, p. 1085-1091, 2014.
- [129] F. Zinzindohoué, T. Lecomte, et P. Laurent-Puig, « [Matrix metalloproteinases and gastrointestinal tract cancers] », *Gastroenterol. Clin. Biol.*, vol. 29, n° 4, p. 434-444, avr. 2005.
- [130] G. A. Conlon et G. I. Murray, « Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis », *J. Pathol.*, déc. 2018.
- [131] K. E. Lee *et al.*, « German Cockroach Extract Induces Matrix Metalloproteinase-1 Expression, Leading to Tight Junction Disruption in Human Airway Epithelial Cells », *Yonsei Med. J.*, vol. 59, n° 10, p. 1222-1231, déc. 2018.
- [132] J. Gross et C. M. Lapierre, « Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 48, p. 1014-1022, juin 1962.
- [133] R. Visse et H. Nagase, « Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry », *Circulation Research*, vol. 92, n° 8, p. 827-839, mai 2003.
- [134] Stamenkovic I, « Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. S », *Semin Cancer Biol*, p. Semin Cancer Biol, 2000.
- [135] Christophe Chantrain, Yves A. DeClerck, « Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale », *m/s*, p. 565-575, 2002.

- [136] A. Jain et R. Bahuguna, « Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview », *J Oral Biol Craniofac Res*, vol. 5, n° 3, p. 212-218, déc. 2015.
- [137] L. W. Boushell, M. Kaku, Y. Mochida, R. Bagnell, et M. Yamauchi, « Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin », *Arch. Oral Biol.*, vol. 53, n° 2, p. 109-116, févr. 2008.
- [138] A. Mazzone *et al.*, « Biochemical and immunohistochemical identification of MMP-7 in human dentin », *Journal of Dentistry*, vol. 79, p. 90-95, déc. 2018.
- [139] M. Goldberg *et al.*, « The dentino-enamel junction revisited », *Connect. Tissue Res.*, vol. 43, n° 2-3, p. 482-489, 2002.
- [140] C. Chaussain-Miller, F. Fioretti, M. Goldberg, et S. Menashi, « The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries », *J. Dent. Res.*, vol. 85, n° 1, p. 22-32, janv. 2006.
- [141] Z. Zhang, X. Yang, H. Zhang, X. Liu, S. Pan, et C. Li, « The role of extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation in regulating matrix metalloproteinases in periodontitis », *J. Periodont. Res.*, vol. 53, n° 3, p. 391-402, juin 2018.
- [142] H. Luo *et al.*, « Inhibition of SOX9 Promotes Inflammatory and Immune Responses of Dental Pulp », *J Endod*, vol. 44, n° 5, p. 792-799, mai 2018.
- [143] P.-S. Lin *et al.*, « Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling », *J. Formos. Med. Assoc.*, vol. 116, n° 5, p. 351-358, mai 2017.
- [144] D. G. Soares, Z. Zhang, F. Mohamed, T. W. Eyster, C. A. de Souza Costa, et P. X. Ma, « Simvastatin and nanofibrous poly(l-lactic acid) scaffolds to promote the odontogenic potential of dental pulp cells in an inflammatory environment », *Acta Biomater*, vol. 68, p. 190-203, 01 2018.
- [145] Catherine Mattout, *GEPI*, vol. 10, p. 23-26, mars 2010.
- [146] L. Zhang, X. Li, H. Yan, et L. Huang, « Salivary matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a biomarker for periodontitis: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis », *Medicine (Baltimore)*, vol. 97, n° 3, p. e9642, janv. 2018.
- [147] J. S. Prasanna, M. D. Aishwarya, P. Karunakar, K. Rekharani, B. Vijayalakshmi, et P. Jharna, « Evaluation of collagenase-3 matrix metalloproteinase-13 gene-associated polymorphisms 11A/12A and -77A/G and its associated alleles with and without periodontitis », *J Indian Soc Periodontol*, vol. 22, n° 6, p. 474-479, déc. 2018.
- [148] W. J. Rody, M. Wijegunasinghe, L. S. Holliday, K. P. McHugh, et S. M. Wallet, « Immunoassay analysis of proteins in gingival crevicular fluid samples from resorbing teeth », *Angle Orthod*, vol. 86, n° 2, p. 187-192, mars 2016.
- [149] S. Davinelli, M. Nielsen, et G. Scapagnini, « Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review », *Nutrients*, vol. 10, n° 4, p. 522, avr. 2018.
- [150] R. R. Ambati, S. M. Phang, S. Ravi, et R. G. Aswathanarayana, « Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review », *Mar Drugs*, vol. 12, n° 1, p. 128-152, janv. 2014.
- [151] S. Fakhri, F. Abbaszadeh, L. Dargahi, et M. Jorjani, « Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits », *Pharmacol. Res.*, vol. 136, p. 1-20, août 2018.
- [152] B. McCall, C. McPartland, R. Moore, A. Frank-Kamenetskii, et B. Booth, « Effects of Astaxanthin on the Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells In Vitro », *Antioxidants*, vol. 7, n° 10, p. 135, oct. 2018.

- [153] F. K. El-Baz, R. A. Hussein, G. A. R. Abdel Jaleel, et D. O. Saleh, « Astaxanthin-Rich Haematococcus pluvialis Algal Hepatic Modulation in D-Galactose-Induced Aging in Rats: Role of Nrf2 », *Adv Pharm Bull*, vol. 8, n° 3, p. 523-528, août 2018.
- [154] V. Rodriguez-Ruiz *et al.*, « Astaxanthin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Preservation of Antioxidant Activity », *Molecules*, vol. 23, n° 10, oct. 2018.
- [155] T. A. Kwan, S. E. Kwan, J. Peccia, et J. B. Zimmerman, « Selectively biorefining astaxanthin and triacylglycerol co-products from microalgae with supercritical carbon dioxide extraction », *Bioresour. Technol.*, vol. 269, p. 81-88, déc. 2018.
- [156] P. Otero, S. K. Saha, J. M. Gushin, S. Moane, J. Barron, et P. Murray, « Identification of optimum fatty acid extraction methods for two different microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Haematococcus pluvialis* for food and biodiesel applications », *Anal Bioanal Chem*, vol. 409, n° 19, p. 4659-4667, juill. 2017.
- [157] R. R. Ambati, S. M. Phang, S. Ravi, et R. G. Aswathanarayana, « Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review », *Mar Drugs*, vol. 12, n° 1, p. 128-152, janv. 2014.
- [158] S. Dong, Y. Huang, R. Zhang, S. Wang, et Y. Liu, « Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis* », *ScientificWorldJournal*, vol. 2014, p. 694305, 2014.
- [159] X. Cheng, Z. Qi, T. Burdyny, T. Kong, et D. Sinton, « Low pressure supercritical CO<sub>2</sub> extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* demonstrated on a microfluidic chip », *Bioresour. Technol.*, vol. 250, p. 481-485, févr. 2018.
- [160] M. F. J. Raposo, A. M. M. B. Morais, et R. M. S. C. Morais, « Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, n° 3, p. 1253-1257, mars 2012.
- [161] F. Villalobos-Castillejos, P. Cerezal-Mezquita, M. L. Hernández-De Jesús, et B. E. Barragán-Huerta, « Production and stability of water-dispersible astaxanthin oleoresin from *Phaffia rhodozyma* », *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 48, n° 6, p. 1243-1251, juin 2013.
- [162] C. Yuan, L. Du, Z. Jin, et X. Xu, « Storage stability and antioxidant activity of complex of astaxanthin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin », *Carbohydrate Polymers*, vol. 91, n° 1, p. 385-389, janv. 2013.
- [163] Y. M. Naguib, « Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, n° 4, p. 1150-1154, avr. 2000.
- [164] C. Farruggia *et al.*, « Astaxanthin exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in macrophages in NRF2-dependent and independent manners », *J. Nutr. Biochem.*, vol. 62, p. 202-209, sept. 2018.
- [165] M. Ishikawa *et al.*, « Carotenoid Stereochemistry Affects Antioxidative Activity of Liposomes Co-encapsulating Astaxanthin and Tocotrienol », *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 66, n° 7, p. 714-720, 2018.
- [166] N. Ito, S. Seki, et F. Ueda, « The Protective Role of Astaxanthin for UV-Induced Skin Deterioration in Healthy People-A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial », *Nutrients*, vol. 10, n° 7, juin 2018.
- [167] N. P. Turrin et S. Rivest, « Molecular and Cellular Immune Mediators of Neuroprotection », *Molecular Neurobiology*, vol. 34, n° 3, p. 221-242, 2006.
- [168] H. Kang et H. Kim, « Astaxanthin and  $\beta$ -carotene in *Helicobacter pylori*-induced Gastric Inflammation: A Mini-review on Action Mechanisms », *J Cancer Prev*, vol. 22, n° 2, p. 57-61, juin 2017.
- [169] S.-K. Choi, Y.-S. Park, D.-K. Choi, et H.-I. Chang, « Effects of astaxanthin on the production of NO and the expression of COX-2 and iNOS in LPS-stimulated BV2 microglial cells », *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 18, n° 12, p. 1990-1996, déc. 2008.

- [170] X.-Y. Zhou *et al.*, « Depression can be prevented by astaxanthin through inhibition of hippocampal inflammation in diabetic mice », *Brain Res.*, vol. 1657, p. 262-268, 15 2017.
- [171] K. Shanmugapriya, H. Kim, P. S. Saravana, B.-S. Chun, et H. W. Kang, « Astaxanthin-alpha tocopherol nanoemulsion formulation by emulsification methods: Investigation on anticancer, wound healing, and antibacterial effects », *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 172, p. 170-179, août 2018.
- [172] L. Zhang et H. Wang, « Multiple Mechanisms of Anti-Cancer Effects Exerted by Astaxanthin », *Mar Drugs*, vol. 13, n° 7, p. 4310-4330, juill. 2015.
- [173] H. Meng, X. Ni, H. Yu, S. Wang, et S. Shen, « Effects of astaxanthin on oxidative stress induced by Cu<sup>2+</sup> in prostate cells », *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, vol. 18, n° 2, p. 161-171, févr. 2017.
- [174] X. Ni, H. Yu, S. Wang, C. Zhang, et S. Shen, « Astaxanthin Inhibits PC-3 Xenograft Prostate Tumor Growth in Nude Mice », *Mar Drugs*, vol. 15, n° 3, mars 2017.
- [175] P. N. Prabhu, P. Ashokkumar, et G. Sudhandiran, « Antioxidative and antiproliferative effects of astaxanthin during the initiation stages of 1,2-dimethyl hydrazine-induced experimental colon carcinogenesis », *Fundam Clin Pharmacol*, vol. 23, n° 2, p. 225-234, avr. 2009.
- [176] T. Maoka, H. Tokuda, N. Suzuki, H. Kato, et H. Etoh, « Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, and anti-carcinogenesis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein, the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxy nitrite », *Mar Drugs*, vol. 10, n° 6, p. 1391-1399, juin 2012.
- [177] S. Zaman, R. Wang, et V. Gandhi, « Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies », *Leuk. Lymphoma*, vol. 55, n° 9, p. 1980-1992, sept. 2014.
- [178] S. Elmore, « Apoptosis: a review of programmed cell death », *Toxicol Pathol*, vol. 35, n° 4, p. 495-516, juin 2007.
- [179] P. Kidd, « Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential », *Altern Med Rev*, vol. 16, n° 4, p. 355-364, déc. 2011.
- [180] I. Baralic *et al.*, « Effect of Astaxanthin Supplementation on Salivary IgA, Oxidative Stress, and Inflammation in Young Soccer Players », *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2015, p. 783761, 2015.
- [181] J. H. Han *et al.*, « Astaxanthin alleviated ethanol-induced liver injury by inhibition of oxidative stress and inflammatory responses via blocking of STAT3 activity », *Sci Rep*, vol. 8, n° 1, p. 14090, sept. 2018.
- [182] A. P. Bolin, B. A. Guerra, S. J. S. Nascimento, et R. Otton, « Changes in lymphocyte oxidant/antioxidant parameters after carbonyl and antioxidant exposure », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 14, n° 4, p. 690-697, déc. 2012.
- [183] T. Dolma, R. Mukherjee, B. K. Pati, et U. K. De, « Acute Phase Response and Neutrophils : Lymphocyte Ratio in Response to Astaxanthin in Staphylococcal Mice Mastitis Model », *J Vet Med*, vol. 2014, p. 147652, 2014.
- [184] C.-I. Choi, « Astaxanthin as a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Modulator: Its Therapeutic Implications », *Mar Drugs*, vol. 17, n° 4, avr. 2019.
- [185] M. Moritsuka, Y. Kitasako, M. F. Burrow, M. Ikeda, J. Tagami, et S. Nomura, « Quantitative assessment for stimulated saliva flow rate and buffering capacity in relation to different ages », *J Dent*, vol. 34, n° 9, p. 716-720, oct. 2006.
- [186] C. Naulin-Ifi, *Odontologie pédiatrique clinique*. Reuil-Malmaison: Éd. CdP : Wolters Kluwer France, 2011.
- [187] A. Esmaeeli, M. Esmaeeli, M. Ebrahimi, et A. Nasehi, « Association between oral findings and laboratory tests in children and adolescents undergoing dialysis: A cross-sectional study », *J Clin Exp Dent*, vol. 10, n° 5, p. e462-e468, mai 2018.

- [188] Q. Yue *et al.*, « Carious status and supragingival plaque microbiota in hemodialysis patients », *PLoS ONE*, vol. 13, n° 10, p. e0204674, 2018.
- [189] I. Benghalem *et al.*, « High-density lipoprotein immunomodulates the functional activities of macrophage and cytokines produced during ex vivo macrophage-CD4+ T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes », *Cytokine*, vol. 96, p. 59-70, 2017.
- [190] W. Nouari, L. Ysmail-Dahlouk, et M. Aribi, « Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa* », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 30, p. 94-101, janv. 2016.
- [191] A. Richardson, C. Hao, et S. Fedoroff, « Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia », *Glia*, vol. 7, n° 1, p. 25-33, janv. 1993.
- [192] P. Selvaraj, S. Prabhu Anand, M. Harishankar, et K. Alagarasu, « Plasma 1,25 Dihydroxy Vitamin D3 Level and Expression of Vitamin D Receptor and Cathelicidin in Pulmonary Tuberculosis », *Journal of Clinical Immunology*, vol. 29, n° 4, p. 470-478, juill. 2009.
- [193] M. L. Torres-Rodríguez, E. García-Chávez, M. Berhow, et E. G. de Mejia, « Anti-inflammatory and anti-oxidant effect of *Calea urticifolia* lyophilized aqueous extract on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages », *J Ethnopharmacol.*, vol. 188, p. 266-274, juill. 2016.
- [194] W.-P. Chen, Y. Xiong, Y.-X. Shi, P.-F. Hu, J.-P. Bao, et L.-D. Wu, « Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase expression in human chondrocytes », *International Immunopharmacology*, vol. 19, n° 1, p. 174-177, mars 2014.
- [195] M. Miliani, M. Nouar, O. Paris, G. Lefranc, F. Mennechet, et M. Aribi, « Thymoquinone Potently Enhances the Activities of Classically Activated Macrophages Pulsed with Necrotic Jurkat Cell Lysates and the Production of Antitumor Th1-/M1-Related Cytokines », *J. Interferon Cytokine Res.*, nov. 2018.
- [196] M. Aribi, « Macrophage Bactericidal Assays », *Methods Mol. Biol.*, vol. 1784, p. 135-149, 2018.
- [197] « Gornall AG, Bardawill CS, David MM. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction ».
- [198] M. So, Y. A. Ellenikiotis, H. M. Husby, C. L. Paz, B. Seymour, et K. Sokal-Gutierrez, « Early Childhood Dental Caries, Mouth Pain, and Malnutrition in the Ecuadorian Amazon Region », *Int J Environ Res Public Health*, vol. 14, n° 5, 22 2017.
- [199] D. V. Bonotto, G. R. Montes, F. M. Ferreira, L. R. da S. Assunção, et F. C. Fraiz, « Association of parental attitudes at mealtime and snack limits with the prevalence of untreated dental caries among preschool children », *Appetite*, vol. 108, p. 450-455, 01 2017.
- [200] J. Hu *et al.*, « Dental Caries Status and Caries Risk Factors in Students Ages 12-14 Years in Zhejiang, China », *Med. Sci. Monit.*, vol. 24, p. 3670-3678, juin 2018.
- [201] R. D. Holmes, « Tooth brushing frequency and risk of new carious lesions », *Evid Based Dent*, vol. 17, n° 4, p. 98-99, 2016.
- [202] H. Zimmermann, N. Zimmermann, D. Hagenfeld, A. Veile, T.-S. Kim, et H. Becher, « Is frequency of tooth brushing a risk factor for periodontitis? A systematic review and meta-analysis », *Community Dent Oral Epidemiol*, vol. 43, n° 2, p. 116-127, avr. 2015.
- [203] B. P. Preethi, D. Reshma, et P. Anand, « Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Proteins and Total Antioxidant Capacity Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children: An In Vivo Study », *Indian J Clin Biochem*, vol. 25, n° 4, p. 425-428, oct. 2010.

- [204] D. Animireddy, V. T. Reddy Bekkem, P. Vallala, S. B. Kotha, S. Ankireddy, et N. Mohammad, « Evaluation of pH, buffering capacity, viscosity and flow rate levels of saliva in caries-free, minimal caries and nursing caries children: An in vivo study », *Contemp Clin Dent*, vol. 5, n° 3, p. 324-328, juill. 2014.
- [205] P. Kudva, N. Saini, H. Kudva, et V. Saini, « To estimate salivary aspartate aminotransferase levels in chronic gingivitis and chronic periodontitis patients prior to and following non-surgical periodontal therapy: A clinico-biochemical study », *Journal of Indian Society of Periodontology*, vol. 18, n° 1, p. 53, 2014.
- [206] S. Thaweboon, B. Thaweboon, S. Nakornchai, et S. Jitmaitree, « Salivary secretory IgA, pH, flow rates, mutans streptococci and Candida in children with rampant caries », *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, vol. 39, n° 5, p. 893-899, sept. 2008.
- [207] A. Prabhakar, R. Dodawad, et R. Os, « Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Protein and Total Antioxidant Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children-An In Vivo Study », *Int J Clin Pediatr Dent*, vol. 2, n° 1, p. 9-12, janv. 2009.
- [208] M. Lenander-Lumikari et V. Loimaranta, « Saliva and dental caries », *Adv. Dent. Res.*, vol. 14, p. 40-47, déc. 2000.
- [209] O. Tulunoglu, S. Demirtas, et I. Tulunoglu, « Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender », *Int J Paediatr Dent*, vol. 16, n° 3, p. 186-191, mai 2006.
- [210] Y. Vered, A. Livny, A. Zini, et H. D. Sgan-Cohen, « Periodontal health status and smoking among young adults », *J. Clin. Periodontol.*, vol. 35, n° 9, p. 768-772, sept. 2008.
- [211] P. N. Galgut, « The relevance of pH to gingivitis and periodontitis », *J Int Acad Periodontol*, vol. 3, n° 3, p. 61-67, juill. 2001.
- [212] K. S. Rajesh, null Zareena, S. Hegde, et M. S. Arun Kumar, « Assessment of salivary calcium, phosphate, magnesium, pH, and flow rate in healthy subjects, periodontitis, and dental caries », *Contemp Clin Dent*, vol. 6, n° 4, p. 461-465, déc. 2015.
- [213] I. Struzycka, « The oral microbiome in dental caries », *Pol. J. Microbiol.*, vol. 63, n° 2, p. 127-135, 2014.
- [214] M. Kjeldsen, P. Holmstrup, et K. Bendtzen, « Marginal periodontitis and cytokines: a review of the literature », *J. Periodontol.*, vol. 64, n° 11, p. 1013-1022, nov. 1993.
- [215] R. Saini, P. P. Marawar, S. Shete, et S. Saini, « Periodontitis, a true infection », *J Glob Infect Dis*, vol. 1, n° 2, p. 149-150, juill. 2009.
- [216] A. Simon-Soro *et al.*, « Combined analysis of the salivary microbiome and host defence peptides predicts dental disease », *Sci Rep*, vol. 8, n° 1, p. 1484, 24 2018.
- [217] R. Durand *et al.*, « Dental caries are positively associated with periodontal disease severity », *Clin Oral Investig*, janv. 2019.
- [218] V. Ballal, S. Rao, A. Bagheri, V. Bhat, T. Attin, et M. Zehnder, « MMP-9 in Dentinal Fluid Correlates with Caries Lesion Depth », *Caries Research*, vol. 51, n° 5, p. 460-465, 2017.
- [219] K. C. El Kasmi et K. R. Stenmark, « Contribution of metabolic reprogramming to macrophage plasticity and function », *Semin. Immunol.*, vol. 27, n° 4, p. 267-275, août 2015.
- [220] A. Chauhan *et al.*, « M1 Macrophage Polarization Is Dependent on TRPC1-Mediated Calcium Entry », *iScience*, vol. 8, p. 85-102, oct. 2018.
- [221] C. Chantrain et Y. A. DeClerck, « Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale », *médecine/sciences*, vol. 18, n° 5, p. 565-575, mai 2002.

- [222] M. Maciejczyk, A. Pietrzykowska, A. Zalewska, M. Knaś, et I. Daniszewska, « The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases », *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, vol. 25, n° 2, p. 383-390, 2016.
- [223] A. L. D. L. Andrade, E. M. Santos, A. F. Carmo, R. A. Freitas, et H. C. Galvão, « Analysis of tryptase-positive mast cells and immunoexpression of MMP-9 and MMP-13 in periapical lesions », *Int Endod J*, vol. 50, n° 5, p. 446-454, mai 2017.
- [224] L. Tjäderhane et T. Salo, « Expression of matrix metalloproteinase-13 in odontoblast-like cells », *International Endodontic Journal*, vol. 46, n° 10, p. 1006-1007, oct. 2013.
- [225] M. Hernández Ríos *et al.*, « Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade: MMP-13 in periodontitis progression », *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 36, n° 12, p. 1011-1017, déc. 2009.
- [226] P. N. Tannure *et al.*, « MMP13 Polymorphism Decreases Risk for Dental Caries », *Caries Research*, vol. 46, n° 4, p. 401-407, 2012.
- [227] C. Loreto, C. Galanti, G. Musumeci, M. C. Rusu, et R. Leonardi, « Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase-13 in human caries dentin », *Eur J Histochem*, vol. 58, n° 1, p. 2318, mars 2014.
- [228] Y. Shimada, S. Ichinose, A. Sadr, M. F. Burrow, et J. Tagami, « Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine », *Aust Dent J*, vol. 54, n° 4, p. 347-354, déc. 2009.
- [229] Y. M. Alyousef *et al.*, « Association of MBL2 Gene Polymorphism with Dental Caries in Saudi Children », *Caries Res.*, vol. 51, n° 1, p. 12-16, 2017.
- [230] M. Du *et al.*, « Effects of IL-1 $\beta$  on MMP-9 Expression in Cementoblast-Derived Cell Line and MMP-Mediated Degradation of Type I Collagen », *Inflammation*, janv. 2019.
- [231] C. Yu, Y. Lixia, G. Ruiwei, S. Yankun, et Y. Jinshan, « The Role of FAK in the Secretion of MMP9 after CD147 Stimulation in Macrophages », *Int Heart J*, vol. 59, n° 2, p. 394-398, mars 2018.
- [232] T. Yucel-Lindberg et T. Båge, « Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis », *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 15, janv. 2013.
- [233] J. Sarkar, S. K. Nandy, A. Chowdhury, T. Chakraborti, et S. Chakraborti, « Inhibition of MMP-9 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking analysis », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 84, p. 340-347, déc. 2016.
- [234] W. Tong, Q. Wang, D. Sun, et J. Suo, « Curcumin suppresses colon cancer cell invasion via AMPK-induced inhibition of NF- $\kappa$ B, uPA activator and MMP9 », *Oncol Lett*, vol. 12, n° 5, p. 4139-4146, nov. 2016.
- [235] Q. Liu *et al.*, « Grape seed extract ameliorates bleomycin-induced mouse pulmonary fibrosis », *Toxicol. Lett.*, vol. 273, p. 1-9, mai 2017.
- [236] S. R. Guru, S. V. Kothiwale, N. Saroch, et R. C. Guru, « Comparative evaluation of inhibitory effect of curcumin and doxycycline on matrix metalloproteinase-9 activity in chronic periodontitis », *Indian J Dent Res*, vol. 28, n° 5, p. 560-565, oct. 2017.
- [237] A. M. Trufello, B. U. Orellana, C. L. Moraga, C. L. Puente, et I. Morales-Bozo, « Subclinical concentrations of chlorhexidine inhibit gelatinase activity of carious dentine *in vitro* », *Australian Dental Journal*, vol. 59, n° 1, p. 81-86, mars 2014.
- [238] R. Ahmad, H. Y. Qureshi, M. El Mabrouk, J. Sylvester, M. Ahmad, et M. Zafarullah, « Inhibition of interleukin 1-induced matrix metalloproteinase 13 expression in human chondrocytes by interferon gamma », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 66, n° 6, p. 782-789, juin 2007.

- [239] G. N. Smith, E. A. Mickler, K. A. Hasty, et K. D. Brandt, « Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: relationship to structure of the enzyme », *Arthritis Rheum.*, vol. 42, n° 6, p. 1140-1146, juin 1999.
- [240] X.-S. Zhang *et al.*, « Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase-9 expression and activity in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage in rats », *Brain Research*, vol. 1624, p. 113-124, oct. 2015.
- [241] J. M. Cavaillon, « Cytokines and macrophages », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 48, n° 10, p. 445-453, 1994.
- [242] O. V. Horst, J. A. Horst, R. Samudrala, et B. A. Dale, « Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth », *BMC Immunol.*, vol. 12, p. 9, janv. 2011.
- [243] H. Yumoto *et al.*, « The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity », *Jpn Dent Sci Rev*, vol. 54, n° 3, p. 105-117, août 2018.
- [244] D. Cogulu *et al.*, « Associations of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, and IL-10 with dental caries », *J Oral Sci*, vol. 57, n° 1, p. 31-36, mars 2015.
- [245] A. Moeintaghavi *et al.*, « The Effects of Smoking on Expression of IL-12 and IL-1 $\beta$  in Gingival Tissues of Patients with Chronic Periodontitis », *The Open Dentistry Journal*, vol. 11, n° 1, p. 595-602, nov. 2017.
- [246] T. George, P. Kumaran, R. B. Varma, A. M. Xavier, S. K. Janardhanan, et B. S. Govinda, « Salivary interleukin-6 levels in children with early childhood caries and ventricular septal defect », *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, vol. 36, n° 2, p. 130-134, juin 2018.
- [247] E. Pirim Gorgun, H. Toker, E. M. Korkmaz, et O. Poyraz, « IL-6 and IL-10 gene polymorphisms in patients with aggressive periodontitis: effects on GCF, serum and clinic parameters », *Braz Oral Res*, vol. 31, p. e12, 16 2017.
- [248] T. Tanaka, M. Narazaki, et T. Kishimoto, « IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 6, n° 10, p. a016295-a016295, oct. 2014.
- [249] S. Masli et B. Turpie, « Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor- $\beta$ -treated antigen-presenting cells: TNF-R2 function in tolerogenic APCs », *Immunology*, vol. 127, n° 1, p. 62-72, mai 2009.
- [250] J. Bradley, « TNF-mediated inflammatory disease », *The Journal of Pathology*, vol. 214, n° 2, p. 149-160, janv. 2008.
- [251] E. M. Cardoso, C. Reis, et M. C. Manzanares-Céspedes, « Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases », *Postgrad Med*, vol. 130, n° 1, p. 98-104, janv. 2018.
- [252] D. M. Mosser et X. Zhang, « Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine », *Immunol. Rev.*, vol. 226, p. 205-218, déc. 2008.
- [253] D. R. Park *et al.*, « FlexPro MD, a Mixture of Krill Oil, Astaxanthin, and Hyaluronic Acid, Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokine Production Through Inhibition of NF- $\kappa$ B », *J Med Food*, vol. 19, n° 12, p. 1196-1203, déc. 2016.
- [254] M. G. Sorci-Thomas et M. J. Thomas, « Microdomains, Inflammation, and Atherosclerosis », *Circ. Res.*, vol. 118, n° 4, p. 679-691, févr. 2016.
- [255] T. J. Guzik, R. Korbut, et T. Adamek-Guzik, « Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation », *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 54, n° 4, p. 469-487, déc. 2003.
- [256] P. Cassini-Vieira *et al.*, « iNOS Activity Modulates Inflammation, Angiogenesis, and Tissue Fibrosis in Polyether-Polyurethane Synthetic Implants », *Mediators of Inflammation*, vol. 2015, p. 1-9, 2015.

- [257] T. Persichini, O. Cantoni, H. Suzuki, et M. Colasanti, « Cross-Talk Between Constitutive and Inducible NO Synthase: An Update », *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 8, n° 5-6, p. 949-954, mai 2006.
- [258] J. M. Dzik, « Evolutionary roots of arginase expression and regulation », *Front Immunol*, vol. 5, p. 544, 2014.
- [259] R. B. Caldwell, H. A. Toque, S. P. Narayanan, et R. W. Caldwell, « Arginase: an old enzyme with new tricks », *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 36, n° 6, p. 395-405, juin 2015.
- [260] S. M. Morris, « Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 157, n° 6, p. 922-930, juill. 2009.
- [261] P. J. Popovic, H. J. Zeh, et J. B. Ochoa, « Arginine and immunity », *J. Nutr.*, vol. 137, n° 6 Suppl 2, p. 1681S-1686S, 2007.
- [262] T. W. Hein, C. Zhang, W. Wang, C.-I. Chang, N. Thengchaisri, et L. Kuo, « Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase », *FASEB J.*, vol. 17, n° 15, p. 2328-2330, déc. 2003.
- [263] X.-Q. Zhu *et al.*, « Effects of Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Tolerized Monocytes on Inflammatory Responses in Neutrophils », *PLoS ONE*, vol. 11, n° 8, p. e0161482, 2016.
- [264] P. Yang, S. Huang, et A. Xu, « The Oxidative Burst System in Amphioxus », in *Amphioxus Immunity*, Elsevier, 2016, p. 153-165.
- [265] C. Jagruthi *et al.*, « Effect of dietary astaxanthin against Aeromonas hydrophila infection in common carp, Cyprinus carpio », *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 41, n° 2, p. 674-680, déc. 2014.
- [266] A. P. Bolin, R. C. Macedo, D. P. Marin, M. P. Barros, et R. Otton, « Astaxanthin prevents in vitro auto-oxidative injury in human lymphocytes », *Cell Biol. Toxicol.*, vol. 26, n° 5, p. 457-467, oct. 2010.
- [267] J. Kodydková, L. Vávrová, M. Kocík, et A. Žák, « Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases », *Folia Biol. (Praha)*, vol. 60, n° 4, p. 153-167, 2014.
- [268] C. Staerck *et al.*, « Enzymatic Mechanisms Involved in Evasion of Fungi to the Oxidative Stress: Focus on Scedosporium apiospermum », *Mycopathologia*, vol. 183, n° 1, p. 227-239, févr. 2018.
- [269] M. Trebak et J.-P. Kinet, « Calcium signalling in T cells », *Nat. Rev. Immunol.*, janv. 2019.
- [270] G. Ermak et K. J. A. Davies, « Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death », *Mol. Immunol.*, vol. 38, n° 10, p. 713-721, févr. 2002.
- [271] E. Bertero et C. Maack, « Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria », *Circ. Res.*, vol. 122, n° 10, p. 1460-1478, mai 2018.
- [272] X. Lin, Y. Zhao, et S. Li, « Astaxanthin attenuates glutamate-induced apoptosis via inhibition of calcium influx and endoplasmic reticulum stress », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 806, p. 43-51, juill. 2017.
- [273] R. Otton *et al.*, « Combined fish oil and astaxanthin supplementation modulates rat lymphocyte function », *Eur J Nutr*, vol. 51, n° 6, p. 707-718, sept. 2012.
- [274] G. Venter, F. T. J. J. Oerlemans, M. Wijers, M. Willemse, J. A. M. Fransen, et B. Wieringa, « Glucose controls morphodynamics of LPS-stimulated macrophages », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 5, p. e96786, 2014.
- [275] B. Kelly et L. A. J. O'Neill, « Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity », *Cell Res.*, vol. 25, n° 7, p. 771-784, juill. 2015.
- [276] S. Ursoniu, A. Sahebkar, M.-C. Serban, et M. Banach, « Lipid profile and glucose changes after supplementation with astaxanthin: a systematic review and meta-

- analysis of randomized controlled trials », *Arch Med Sci*, vol. 11, n° 2, p. 253-266, avr. 2015.
- [277] M. J. Hubler et A. J. Kennedy, « Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells », *J. Nutr. Biochem.*, vol. 34, p. 1-7, 2016.
- [278] T.-B. Zou, S.-S. Zhu, F. Luo, W.-Q. Li, X.-R. Sun, et H.-F. Wu, « Effects of Astaxanthin on Reverse Cholesterol Transport and Atherosclerosis in Mice », *Biomed Res Int*, vol. 2017, p. 4625932, 2017.

# **A N N E X E S**

## Annexes

## Annexe A . Autorisation de l'éducation nationale de Tlemcen

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التربية الوطنية



مديرية التربية لولاية تلمسان

الأمانة العامة

تلمسان في 05 أكتوبر 2015

الرقم 999.أ.ع/م.ت. 2015/

مدير التربية

إلى

السيد: مدير مخبر البيولوجيا الجزائرية

التطبيقية و علم المناعة

الموضوع: ب/اخ ترخيص

المرجع: - مراسلتكم رقم 51 بتاريخ 2015/09/17.

ردا على طلبكم المشار إليه بالمرجع أعلاه الذي تقدمتم من

خلاله بطلب القيام بمتابعة الأطفال الذين يعانون من النوعية الالغائية

بالمؤسسات التربوية ، يشرفني إبلاغكم بموافقتنا وعليكم الاتصال بالمؤسسات المعنية

للتسيق معها (دون المساس بتمدرس التلاميذ).



عن مدير التربية و بالتفويض منه  
الأمين العام  
زين العابدين جمال خلادي

## Annexe B. Consentement éclairé



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID DE TLEMEN

CENTRE HOSPITALIER ET UNIVERSITAIRE DE TLEMEN

SERVICE D'ODONTOLOGIE CONSERVATRICE /ENDODONTIE

LABORATOIRE DE RECHERCHE N° 51 : Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie



## CONSENTEMENT ECLAIRE

موافقة

أنا السيد(ة): .....  
 مولود بتاريخ: ..... ب.....  
 الساكن ب: .....

أسمح للدكتور بن يلس الهام أستاذة مساعدة متخصصة في محافظة الأسنان بالمستشفى الجامعي بتلمسان.  
 أن اشترك كمريض مؤهل لهذه الدراسة.  
 لجمع كل المعلومات المتعلقة بحالة فمي.  
 النقاط الصور الفوتغرافية المتعلقة بي الزمة لهذه الدراسة.  
 سحب كمية من اللعاب أو الدم إتمام هذه الدراسة.  
 نشر النتائج المتحصل عليها و أخيرا الصور التي تم إلتقاطها مع إخفاء العيون.

M : .....  
 Né (e) le : ..... à.....  
 Demeurant à : .....

J'autorise le Docteur Ilham BEN YELLES, Maître - assistante en Odontologie Conservatrice au CHU Tlemcen.

1. À me recruter en tant que patient (e) éligible dans cette étude.
2. À prendre tous les renseignements concernant mon statut buccal.
3. À prendre toutes les photographies sur ma personne nécessaires à leurs études.
4. A me prendre un prélèvement salivaire et si nécessaire le sang pour effectuer son étude.
5. À publier les résultats obtenus et, éventuellement à diffuser les photographies avec yeux masquées sur ma personne.

Signature du Tuteur/Tutrice

Tlemcen, le : /

تلمسان في: /

انا الممضي اسفله

## Annexe C. Fiche d'observation clinique

### Fiche d'observation clinique des enfants âgés entre 12 et 15 ans de la Région de Tlemcen

Date : / /

Code

Nom : .....	Prénom : .....	Sexe : F <input type="checkbox"/>	M <input type="checkbox"/>
Age : ..... ans			
Commune :	Zone : Urbaine <input type="checkbox"/>	Rurale <input type="checkbox"/>	
Niveau d'instruction : Moyen <input type="checkbox"/>	Secondaire <input type="checkbox"/>	Analphabète <input type="checkbox"/>	
Profession du père :	Profession de la mère		
Niveau de formation du père	Niveau de formation de la mère		
Catégorie professionnelle du père :			
Numéro de Tél :			

Antécédents dentaires : Extraction <input type="checkbox"/>	Soins <input type="checkbox"/>	ODF <input type="checkbox"/>
Pathologies : Asthme <input type="checkbox"/>	Diabète <input type="checkbox"/>	
Conséquences de chimiothérapie <input type="checkbox"/>	Radiothérapie <input type="checkbox"/>	
Sous thérapeutique Psychotropes <input type="checkbox"/>	Antihistaminiques <input type="checkbox"/>	
Syndromes : (Préciser) .....		
Régime riche en : Sucre <input type="checkbox"/>	Lipide <input type="checkbox"/>	Protéine <input type="checkbox"/>
Grignotages : Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	

<b>Examen bucco-dentaire</b>				
Hygiène buccale : Bonne <input type="checkbox"/>	Moyenne <input type="checkbox"/>	Mauvaise <input type="checkbox"/>	Médiocre <input type="checkbox"/>	
Fréquence brossage : 0 Fois <input type="checkbox"/>	1 Fois <input type="checkbox"/>	2 Fois <input type="checkbox"/>	3 Fois et plus <input type="checkbox"/>	
Fréquence consultation dentaire : <input type="checkbox"/> Jamais <input type="checkbox"/> Urgence <input type="checkbox"/> 1 Fois/an <input type="checkbox"/> 2 Fois/an et plus				

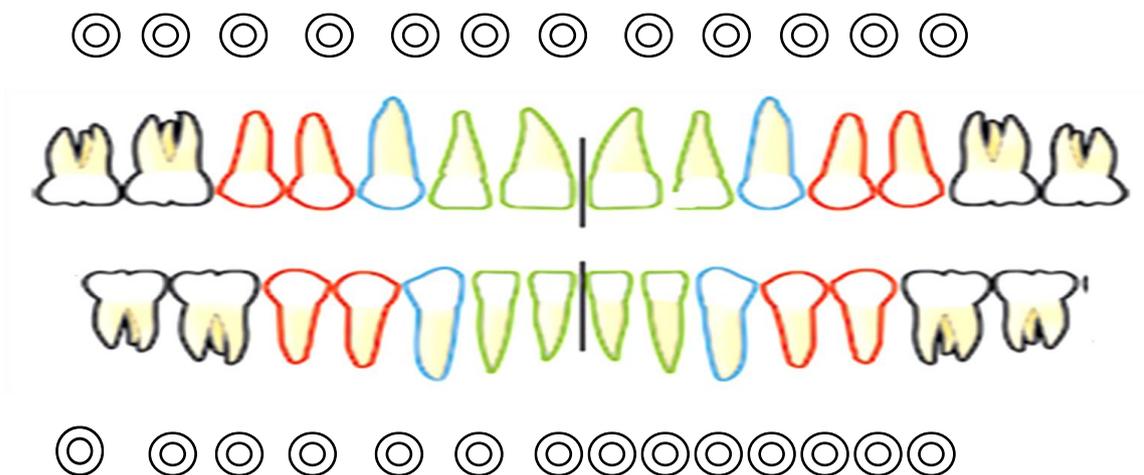
**Examen dentaire**

Indice CAOD / CAOF

Cariée

Absente

Obturée



Cariée

Absente

Obturée

**Examen parodontal :**

Indices/ Dents	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
plaque														
Gingival														
Indices / Dents	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
Plaques														
Gingival														

**DIAGNOSTICS**

Lesions carieuses

Gingivite

Parodontite

Oui

Localisée

Localisée

Non

Généralisée

Généralisée

## Annexe D. Analyse sanguine

Centre Hospitalouniversitaire de Tlemcen						29/05/2017 12:17	
Service d Hematologie clinique LABORATOIRE							
ID échant	23		ID Patient		B R		
Date	29/05/2017 12:15		Nom				
Mode	Human		Date de naissan				
Paramètre	Résultat		Limite	Genre	Male		
GB	11,49	H	10 <sup>3</sup> /μL	5,00	-	10,00	
NEU	1,16	L	10 <sup>3</sup> /μL	2,00	-	7,50	
LYM	4,89	H	10 <sup>3</sup> /μL	1,30	-	4,00	
MON	0,75	H	10 <sup>3</sup> /μL	0,15	-	0,70	
EO	0,59	H	10 <sup>3</sup> /μL	0,00	-	0,50	
BAS	---	**	10 <sup>3</sup> /μL	0,00	-	0,15	
NEU%	10,1	LL	%	40,0	-	75,0	
LYM%	42,6	H	%	21,0	-	40,0	
MON%	6,5		%	3,0	-	7,0	
EO%	5,1	H	%	0,0	-	5,0	
BAS%	---	**	%	0,0	-	1,5	
GR	4,50		10 <sup>9</sup> /μL	4,00	-	5,50	
HB	13,3		g/dL	12,0	-	17,4	
HCT	39,1		%	36,0	-	52,0	
VGM	86,9		fL	76,0	-	96,0	
TCMH	29,5		pg	27,0	-	32,0	
CCMH	34,0		g/dL	30,0	-	35,0	
IDRsd	31,4	L	fL	46,0	-	59,0	
IDRcv	12,8		%	0,0	-	16,0	
PLT	250		10 <sup>3</sup> /μL	150	-	400	
VPM	5,9	L	fL	8,0	-	15,0	
Alarmes d'avertisse	uACDZ						
Alarmes morpholog							
Alarmes d'interprét	Leukocytosis?, Microcytic PLT?						
						Visa Labo	

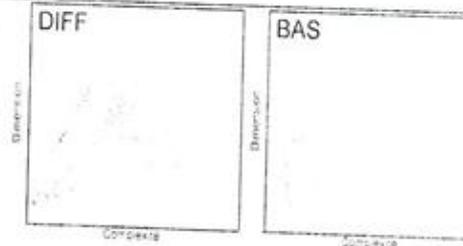
Centre Hospitalo-universitaire de Tiemcen

29/05/2017 12:

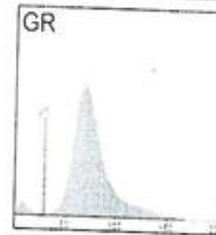
Service d'Hématologie clinique LABORATOIRE

ID échant. 24  
 Date 29/05/2017 12:17  
 Mode Human  
 ID Patient **M M**  
 Nom  
 Date de naissan  
 Genre Male

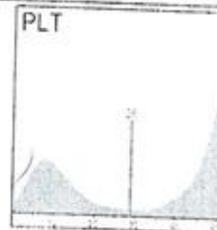
Paramètre	Résultat	Limite
GB	8.67	10 <sup>3</sup> /μL 5.00 - 10.00
NEU	---	10 <sup>3</sup> /μL 2.00 - 7.50
LYM	---	10 <sup>3</sup> /μL 1.30 - 4.00
MON	---	10 <sup>3</sup> /μL 0.15 - 0.70
EO	---	10 <sup>3</sup> /μL 0.00 - 0.50
BAS	---	10 <sup>3</sup> /μL 0.00 - 0.15
NEU%	---	% 40.0 - 75.0
LYM%	---	% 21.0 - 40.0
MON%	---	% 3.0 - 7.0
EO%	---	% 0.0 - 5.0
BAS%	---	% 0.0 - 1.5



GR	5.22	10 <sup>9</sup> /μL 4.00 - 5.50
HB	13.4	g/dL 12.0 - 17.4
HCT	40.6	% 36.0 - 52.0
VGM	77.8	fL 76.0 - 96.0
TCMH	25.7 L	pg 27.0 - 32.0
CCMH	33.1	g/dL 30.0 - 35.0
IDRsd	27.5 L	fL 46.0 - 59.0
IDRcv	14.0	% 0.0 - 16.0



PLT	187	10 <sup>3</sup> /μL 150 - 400
VPM	7.9 L	fL 8.0 - 15.0



Alarmes d'avertisse uADZ  
 Alarmes morpholog  
 Alarmes d'interprèt Microcytic PLT?

Visa Labo

Centre Hospitalo-Universitaire DE TLEMCEM  
Laboratoire D'Hemobiologie  
ADVIA 2120i LE : 31/05/17 10:32

NOM: PAT#: WE  
AGE: SEX: U  
DATE ASP: 31/05/17 10:29 SERVICE:  
Rack & Position:

---

TEST	RESULT	ABN	NORMALS	UNITS
WBC		3,07	( 4 - 10 )	10e3/ $\mu$ L
RBC	4,82		( 4,2 - 6,1 )	10e6/ $\mu$ L
HGB	14,0		( 12 - 19 )	g/dL
HCT	41,4		( 37 - 52 )	%
MCV	85,9		( 80 - 99 )	fL
MCH	29,1		( 27 - 32 )	Pg
MCHC	33,9		( 32 - 36 )	g/dL
CHCM	34,9		( 32 - 36 )	g/dL
CH	29,8		( - - )	Pg
RDW	12,9		( 11 - 16 )	%
RDW	2,62		( 2,2 - 3,2 )	g/dL
PLT	208		( 150 - 400 )	10e3/ $\mu$ L
MPV		6,1	( 6,5 - 9,5 )	fL
%NEUT		38,7	( 50 - 75 )	%
%LYMPH		41,1	( 20 - 40 )	%
%MONO		10,7	( 2 - 10 )	%
%EOS		3,6	( 1 - 3 )	%
%BASO		2,1	( 0 - 1 )	%
%LUC	3,8		( 0 - 4 )	%
%NRBC	0		( 0,0 - 2,0 )	NRBC/100
#NEUT		1,19	( 2 - 7,5 )	10e3/ $\mu$ L
#LYMPH		1,26	( 1,5 - 4 )	10e3/ $\mu$ L
#MONO	0,33		( 0,2 - 1 )	10e3/ $\mu$ L
#EOS	0,11		( 0,04 - 0,4 )	10e3/ $\mu$ L
#BASO	0,07		( 0 - 0,1 )	10e3/ $\mu$ L
#LUC	0,12		( 0 - 0,4 )	10e3/ $\mu$ L
#NRBC	0		( 0,0 - 0,20 )	10e9/L
%RETIC		0,12	( 0,5 - 2,5 )	%
#RETIC		5,5	( 20 - 80 )	10e9/L
MCVr	110,2		( 101 - 119 )	fL
CHCMr	27,9		( 23 - 29 )	g/dL
CHr		30,6	( 25 - 30 )	Pg

## Annexe E : Indice de position socioéconomique

Le calcul de l'Indice de position socioéconomique (IPSE) a été apprécié par cette formule :

$$\text{IPSE} = \text{Age} - 6 \times \text{NF} - 4 \times \text{CP} + 55$$

NF = Niveau de formation ; CP : catégorie professionnelle. (Voir tableau 1, 2, 3)

**Tableau 1: Niveau de formation**

1	Université, haute école
2	Formation professionnelle supérieure
3	Maturité, baccalauréat
4	Maturité professionnelle, école professionnelle
5	Apprentissage
6	Ecole obligatoire
7	Moins que l'école obligatoire

**Tableau 2: Catégories professionnelles**

1	Dirigeants, cadres supérieurs, cadres de direction
2	Professions intellectuelles et scientifiques (ingénieurs, médecins, professeurs, avocats, etc.)
3	Professions intermédiaires (techniciens, infirmiers, comptables, inspecteurs de police, etc.)
4	Employés de type administratif (secrétaires, standardiste, guichetiers, etc.)
5	Personnel des services et de la vente (cuisiniers, serveurs, coiffeurs, pompiers, guides, vendeurs, etc.)
	Agriculteurs, pêcheurs, etc. Agriculteurs, pêcheurs, etc.
6	Artisans et ouvriers (maçons, charpentiers, couvreurs, plâtriers, potiers, orfèvres, bouchers, boulangers, ébénistes, couturiers, etc.)
7	Conducteurs de machine et de robots industriels, grutiers, chauffeurs de taxi, pilotes de locomotive, etc.
	Ouvriers et employés non qualifiés (manutentionnaires, éboueurs, livreurs, aides de ménage, vendeurs ambulants, etc.)

**Tableau 3: Position socioéconomique relative**

<b>Indice</b>	
<b>1-35</b>	Classe inférieure
<b>36- 54</b>	Classe moyenne-inférieure
<b>55-67</b>	Classe moyenne
<b>68-80</b>	Classe moyenne-supérieure
<b>&gt;80</b>	Classe supérieure

## Résumé

**Introduction :** Les affections bucco-dentaires sont des lésions infectieuses multifactorielles, générées par des bactéries pathogènes qui provoquent une cascade d'épisodes inflammatoires qui libèrent des cytokines, protéines et autres médiateurs ; l'objectif primaire de notre étude est d'évaluer l'effet inhibiteur de l'astaxanthine sur les MMP-9 et MMP-13 libérés par le macrophage chez les enfants ayant une maladie carieuse et parodontale. L'objectif secondaire est le calcul de la prévalence de la maladie carieuse et parodontale et l'identification des facteurs de risque.

**Matériels et méthodes :** il s'agit d'une étude hybride : transversale analytique, menée dans différents établissements, incluant 515 enfants scolarisés âgés de 12 à 15 ans, le sang a été prélevé chez quelques donneurs sains et atteints d'infections dentaires, pour différencier les monocytes en macrophages, traités par l'astaxanthine à concentrations graduelles, et activés par le LPS (Lipopolysaccharide), en réalisant plusieurs dosages au niveau du laboratoire BIOMOLIM et ce, afin de montrer l'effet de l'astaxanthine sur les différents rôles du macrophage. Les logiciels utilisés pour la saisie sont respectivement le SPSS et le Graph pad.

**Résultats :** Parmi 515 enfants, 73,9% présentent la maladie carieuse et 68,9% la maladie parodontale, une association entre la maladie carieuse et l'hygiène orale a été mise en évidence (la viscosité de la salive constitue un facteur important dans l'apparition de la maladie carieuse tandis l'hygiène orale médiocre est un facteur de risque pour les deux maladies). Le traitement à l'AST a diminué significativement le taux de production du NO, iNOS, arginase, glucose, ainsi le taux des MMP-9 et MMP-13 libérées par le macrophage au cours des deux lésions. En outre, les niveaux de production du Calcium, du cholestérol, des cytokines proinflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, des TNF $\alpha$  ont diminué considérablement, pour toutes les comparaisons ( $p < 0,0001$ ).

**Conclusion :** la maladie carieuse et parodontale, sont présentes avec des taux préoccupants qui se traduisent par la nécessité d'établir des mesures préventives et le besoin en soin pour le jeune enfant, cependant l'utilisation de l'astaxanthine à une dose de 10 semblerait très efficace pour inhiber l'action des MMP-9 et MMP-13 libérées par le macrophage au cours des deux lésions.

**Mots clés :** Astaxanthine, carie, macrophage, maladie parodontale, MMP-13, MMP-9.

## Abstract

**Introduction:** oral diseases are multifactorial infectious lesions, generated by pathogenic bacteria that cause a cascade of inflammatory episodes that release cytokines, proteins and other mediators, the objective of our study is to evaluate the inhibitory effect of astaxanthin on MMP-9 and MMP-13 released by the macrophage in children with periodontal and carious diseases.

**Purpose:** To show the effect of astaxanthin on the different roles of the macrophage.

**Materials and methods:** Based on a descriptive cross-sectional study, conducted in different randomized settings, including 515 schoolchildren aged 12 to 15 years, blood was recovered from healthy donors with dental infections to differentiate monocytes into macrophages, treated with astaxanthin at gradual concentrations, and activated by LPS (Lipopolysaccharide), by performing several assays

**Results:** Among 515 children, 77% have carious disease and 68.4% have periodontal disease. The viscosity of saliva is an important factor in the development of carious disease while poor oral hygiene is a risk factor for both diseases. AST treatment significantly decreased the rate of NO, iNOS, arginase activity, glucose production, as well as the rate of MMP-9 and MMP-13 released by the macrophage during the two lesions, Furthermore, the production levels of Ca, cholesterol, proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  decreased significantly in patients with and treated with astaxanthin compared to controls, for all comparisons ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusion:** caries and periodontal disease are present with preoccupied rates that result in the need to establish preventive measures and the need for care for the young child, however the use of astaxanthin at a dose of 10 would seem very effective in inhibiting the action of MMP-9 and MMP-13 released by the macrophage during both lesions.

**Keywords:** Macrophage, Carious disease, periodontal disease, astaxanthin, MMP-13, MMP-9.

## المخلص

**مقدمة:** أمراض الفم والأفات المعدية متعددة العوامل الناتجة عن البكتيريا المسببة للأمراض التي تسبب التهابات الحلقات شلال التي تطلق السيتوكينات والبروتينات وغيرها من الوسطاء، والهدف هو تقييم تأثير المثبطة على أستازانثين الميثالوبروتيناز 13 و الميثالوبروتيناز 9 صدر عن البلاعم في الأطفال الذين يعانون من أمراض اللثة والمرض التسوس.

**الهدف:** إظهار تأثير أستازانثين على الأدوار المختلفة للبلاعم.

**المواد وطرق:** من دراسة مستعرضة وصفية، التي أجريت في مختلف المؤسسات العشوائية، بما في ذلك 515 أطفال المدارس الذين تتراوح أعمارهم بين 12 إلى 15 سنة، وقد تم جمع الدم من المتبرعين الأصحاء والمرضى الذين يعانون من التهابات الأسنان، والتفريق حيدات في البلاعم، تعامل مع أستازانثين بتركيزات تدريجية، وتنشط بواسطة ليبوبولسكروريد، من خلال إجراء العديد من المقاييسات

**النتائج:** من 515 أطفال، و 77% لديهم مرض التسوسي واللثة مرض 68.4%، لزوجة اللعاب هو عامل مهم في تطور مرض تسوس في حين أن نظافة الفم المتوسط هو أحد عوامل الخطر لكل من العلاج الأمراض بأستازانثين انخفضت بشكل ملحوظ احادي أكسيد الأزوت معدل الإنتاج، iNOS،

أرجيناز، الجلوكوز، ومعدل الميثالوبروتيناز 9 و الميثالوبروتيناز 13 الصادرة عن الضامة في الأفات اثنين، وذلك مقابل مستويات الإنتاج كاليفورنيا، والكولسترول، السيتوكينات الموالية للالتهابات الانترلوكين-1 $\beta$ ، الانترلوكين-6، انخفض TNF بشكل ملحوظ، لجميع المقارنات ( $p < 0.0001$ ).

**الخلاصة:** تسوس وأمراض اللثة موجودة مع معدلات الفلق من أن يؤدي إلى ضرورة اتخاذ تدابير وقائية والحاجة إلى الرعاية للأطفال الصغار، ومع ذلك، فإن استخدام أستازانثين بجرعة 10 يبدو جدا فعالة في تثبيط عمل الميثالوبروتيناز 13 و الميثالوبروتيناز 9 الصادر عن البلاعم خلال كلا الأفات

**الكلمات المفتاحية :** الاطفال، مرض التسوس، داء اللثة، أستازانثين، الميثالوبروتيناز 13 و الميثالوبروتيناز 9