

Partie 2. Matériels et Méthodes

2.1. Isolement et identification de *Porphyromonas gingivalis*

2.1.1. Prélèvements

Pour la réalisation de cette étude, des échantillons sous-gingivaux ont été prélevés chez des patients reçus en consultation dans le service de parodontologie du centre hospitalo-universitaire de Beni Messous d'Alger.

Les sujets sont atteints de parodontite agressive présentant des poches parodontales profondes, dont le site est de plus de 7 mm de profondeur au cour du sondage. Le saignement lors du sondage et la perte osseuse radiographique faisaient aussi partie des critères de sélection.

Les patients inclus, sont des personnes des deux sexes, âgés entre 18 et 35 ans, ne souffrant pas de maladies systémiques, et qui ne devaient pas avoir fait l'objet d'un traitement parodontal quelconque ou d'une antibiothérapie pour infection d'origine dentaire, au cours des six derniers mois. Ce délai minimise leur impact sur la progression de la maladie.

Les prélèvements doivent être effectués au moins deux heures après toute prise d'aliments, de boisson ou de brossage des dents. Au moment de la collecte, la plaque supra-gingivale est soigneusement retirée à l'aide d'une curette, de compresses et de sérum physiologique stériles, afin d'éviter la contamination de l'échantillon sous gingival.

Après nettoyage, les sites choisis sont isolés de la salive par des rouleaux de coton salivaire puis séchés à l'air. Deux pointes de papier stérile sont introduites dans la poche pour récolter la plaque sous gingivale parodontale. Après 20 à 30 secondes, les pointes sont retirées et sont immédiatement transférées dans un tube de transport pour l'analyse microbiologique. Celle-ci a été réalisée au niveau du laboratoire des anaérobies et du botulisme de l'institut Pasteur d'Algérie (I. P. A).

2.1.2. Transport des échantillons

Les prélèvements sont transportés dans du milieu Amies semi-gélosé dont la composition permet de maintenir la vitalité des bactéries anaérobies strictes. Ce milieu permet également de conserver les anaérobies pendant 24 à 48 heures.

Afin d'éviter les modifications qualificatives et quantitatives de la population sous-gingivale, les échantillons doivent être traités dans un délai de 48 heures après le prélèvement.

2.1.3. Isolement et purification de *Porphyromonas gingivalis*

L'isolement est conduit sur gélose au sang enrichie en hémine (10 µg/ml) et en ménadione (1 µg/ml). Il est réalisé par un simple ensemencement en surface à l'aide de stries transversales. L'incubation est conduite à 37°C pendant 5 jours en atmosphère anaérobie (10% H₂, 10% CO₂, 80%N₂) en déposant les boîtes à l'intérieur d'une jarre model «BD Gas Pak™ EZ, Becton, Dickinson and Company , USA» en présence de générateurs de gaz «Gas Pak™ EZ, Becton, Dickinson and Company , USA».

Les colonies présentant une morphologie et une pigmentation caractéristique sont soigneusement prélevées et repiquées de nouveau et séparément sur le milieu de culture sélectif. Ainsi plusieurs repiquages sont réalisés. Afin de s'acquérir de la pureté de la culture des observations microscopiques après coloration de Gram ont été réalisées.

2.1.4 Pré-identification de *Porphyromonas gingivalis*

Les différents tests de la pré-identification sont les suivants:

➤ Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle qui divise les bactéries en deux classes : Gram + et Gram -. Elle est basée sur la composition différentielle de la paroi en lipides qui sont élevés (20%) chez les Gram- et faibles chez les Gram +.

➤ Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène).

➤ Recherche de l'oxydase

Le cytochrome oxydase ou oxydase est une enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne qui catalyse des réactions d'oxydation.

2.1.5. L'identification biochimique (Galerie API 20 A)

L'identification est effectuée en tenant compte des critères morphologiques des colonies obtenues sur le milieu de culture ainsi que la morphologie cellulaire (observation sous microscope). Seules les souches dont l'aspect macroscopique et microscopique est caractéristique, ainsi dépourvues de catalase et d'oxydase seront retenues.

L'identification de cette espèce est facilitée par l'utilisation d'une galerie biochimique API 20A (BioMérieux, France). La galerie API 20 A est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant.



Figure 9. Galerie biochimique API 20A (BioMérieux, France).

2.1.6. Etude de la sensibilité de *P. gingivalis* aux antibiotiques

L'antibiogramme est réalisé sur gélose Columbia au sang laqué enrichie en ménadione selon la technique de diffusion sur milieu solide.

A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement, une suspension bactérienne a été préparée dans du milieu BHI réduit et supplémenté d'hémine (10 µg/ml) et de ménadione (1 µg/ml) (BHIB-HK). La suspension est bien homogénéisée et dont l'opacité est ajustée au standard Mc Farland 1 (10^8 UFC/ml).

L'ensemencement est soigneusement réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile de manière à obtenir une croissance bactérienne uniforme.

Les disques d'antibiotiques à tester (Tableau 1) sont ainsi appliqués sur la surface de la gélose, ces derniers doivent être espacés de 24 mm, centre à centre. Ensuite les boîtes de pétri sont incubées pendant 48 heures à 37 °C en atmosphère anaérobie.

Tableau 1. Antibiotiques testés et familles d'appartenance.

Famille d'antibiotique	L'antibiotique testé	Charge du disque	L'abréviation
Polymixines	Colistine	10 µg	CT
Aminoside	Kanamycine	1000 µg	K
Glycopeptides	Vancomycine	5 µg	VA

Enfin, les diamètres des zones d'inhibition sont soigneusement mesurés. Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques figurants dans la table de lecture (Annexe 3) afin de classer les deux souches de *P. gingivalis* dans l'une des catégories: Sensibles (S), Intermédiaires(I) ou Résistantes (R).

2.1.6. Conservation des souches isolées

Afin de conserver les isolats à long terme et garder un stock bactérien, les cultures sont congelées à -80°C. 0,6 ml de glycérol stérile est additionné à 1,2 ml du bouillon de culture. Lors de cette étape, une nouvelle coloration de Gram est réalisée pour s'acquérir de la pureté des bouillons de culture.

2.2. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur la croissance de *P. gingivalis*

Une suspension bactérienne est aseptiquement préparée dans du milieu BHI-HK à partir d'une culture jeune de *P. gingivalis*. La densité optique de la suspension est ajustée à l'aide de dilutions, jusqu'à l'obtention de la valeur désirée, puis la suspension est répartie dans une microplaque de 96 puits. Cette dernière est incubée à 37°C pendant 48 heures.

Après incubation, la croissance bactérienne est quantifiée par une lecture de la DO à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques model «Filter Max F5, Molecular Devices, Inc, Autriche».

2.2.1. Effet du pH sur la croissance de *P. gingivalis*

A partir des cultures jeunes de *P. gingivalis*, des suspensions bactériennes sont préparées dans du milieu BHI-HK à différents pH (5,5; 6,5; 7 et 8,5) et ajustées à une DO de 0,2 à 620 nm.

200 µl des suspensions bactériennes sont ajoutés à des microplaques de 96 puits. Ces dernières sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

2.2.2. Effet de la ménadione (vitamine K) sur la croissance de *P. gingivalis*

A partir des cultures jeunes de *P. gingivalis*, des suspensions bactériennes sont préparées dans du milieu dans du milieu BHI-H et ajustée à une DO de 0,2 à 620 nm en présence de concentrations croissantes (0; 0,5 et 1 µg/ml final) de ménadione dont les dilutions ont été préalablement préparées. 200 µl des suspensions bactériennes sont ajoutés à des microplaques de 96 puits. Ces dernières sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

2.2.3. Effet de l'alpha-tocophérol (vitamine E) sur la croissance de *P. gingivalis*

Préparation de l'alpha-tocophérol

L'alpha-tocophérol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) à une concentration initiale de 2 M a été dilué avec l'éthanol afin d'obtenir une solution mère de 50 mM. Les concentrations utilisées dans les expériences ont été ramenées à 50, 100 et 200 μ M dans le milieu de culture. La concentration finale en éthanol doit être minimale afin d'éviter la cytotoxicité de ce dernier. Le milieu de culture servant de contrôle négatif a été complété par le même volume d'éthanol.

La capacité d'alpha-tocophérol à inhiber la croissance de *P. gingivalis* a été évaluée dans du milieu BHI-HK additionné de différentes concentrations d'alpha-tocophérol (50; 100 et 200 μ M). Les suspensions bactériennes sont préparées à partir des cultures jeunes de *P. gingivalis* et dont les DO sont ajustées à 0,3 à 620 nm.

Un volume de 3 ml de chaque suspension bactérienne est déposé dans des tubes en verre. Ces derniers sont ensuite incubés en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

2.3. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur les caractéristiques pariétales de *P. gingivalis*

2.3.1. Préparation des suspensions bactériennes

Les souches bactériennes sont mises en culture à 37°C durant 48 heures dans du milieu BHI-HK à partir des cultures jeunes de *P. gingivalis*. Les cultures bactériennes en suspension sont centrifugées pendant 15 minutes à 5000 g à l'aide d'une centrifugeuse model «Sigma centrifuges 2-16 PK, Allemagne».

Les culots obtenus sont lavés deux fois à l'aide d'un tampon PBS stérile à 0.1 N et remis en suspension dans le même tampon dont le pH est ajusté selon la valeur souhaitée, la densité optique (A_0) est fixée entre 0,8 et 1.

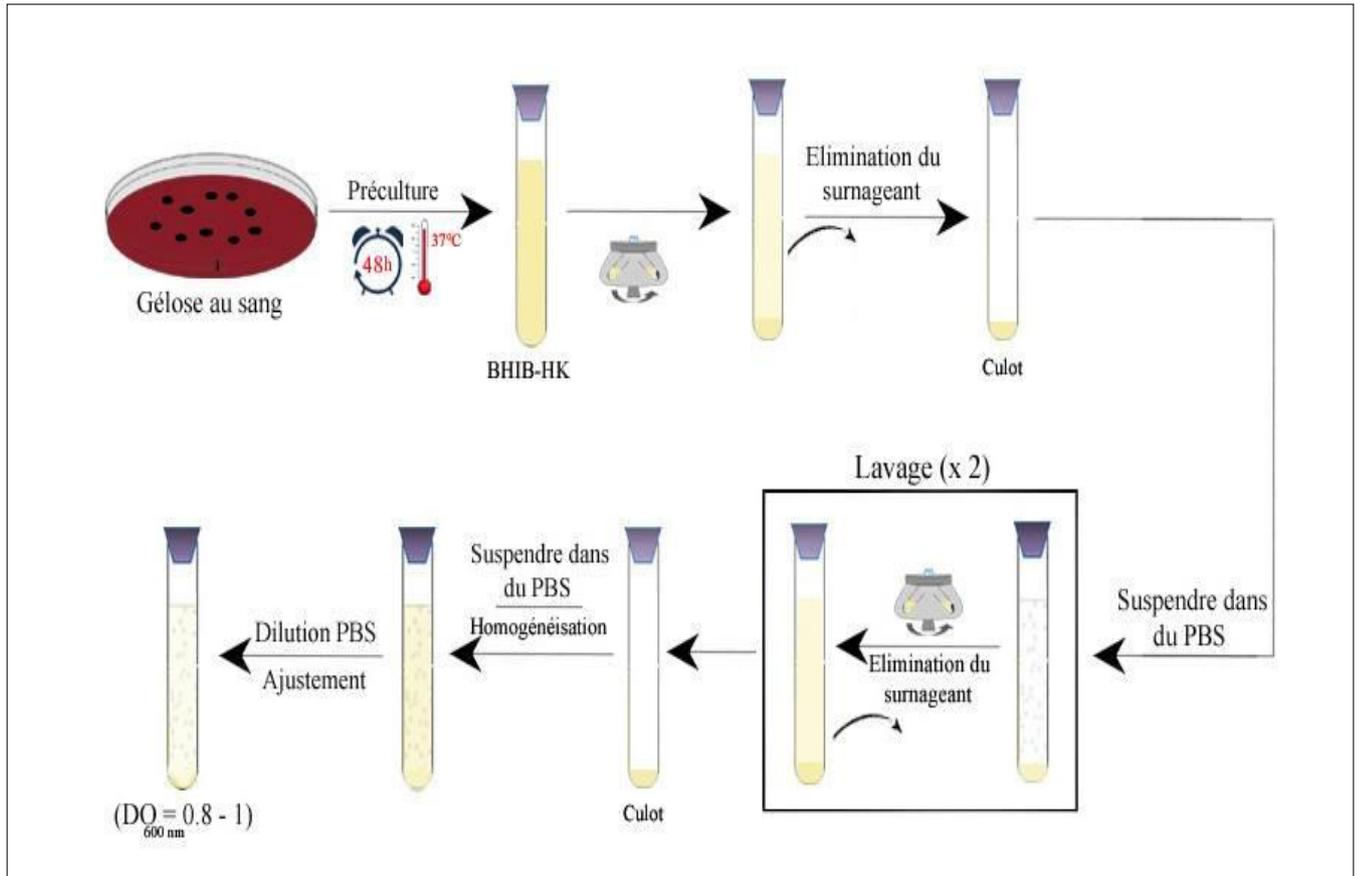


Figure 10. Préparation de la suspension bactérienne.

2.3.2. Détermination de l'hydrophobicité de la paroi de *P. gingivalis*

Le caractère hydrophobe/hydrophile de la paroi cellulaire est déterminé selon le protocole BATH "Bacterial Adhesion to hydrocarbon" (Rosenberg, 1980). L'estimation de l'hydrophobicité est basée sur l'affinité des souches pour hexadécane, un solvant apolaire.

Expérimentalement, 1,8 ml de la suspension bactérienne est vortexé avec 0,3 ml du solvant apolaire pendant 2 minutes afin d'obtenir une émulsion. Après 15 minutes de décantation, la densité optique de la phase aqueuse (A) est mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'adhésion à hexadécane est alors donné par la relation suivante:

$$\% \text{ Adhesion} = (A - A_0/A_0) \times 100$$

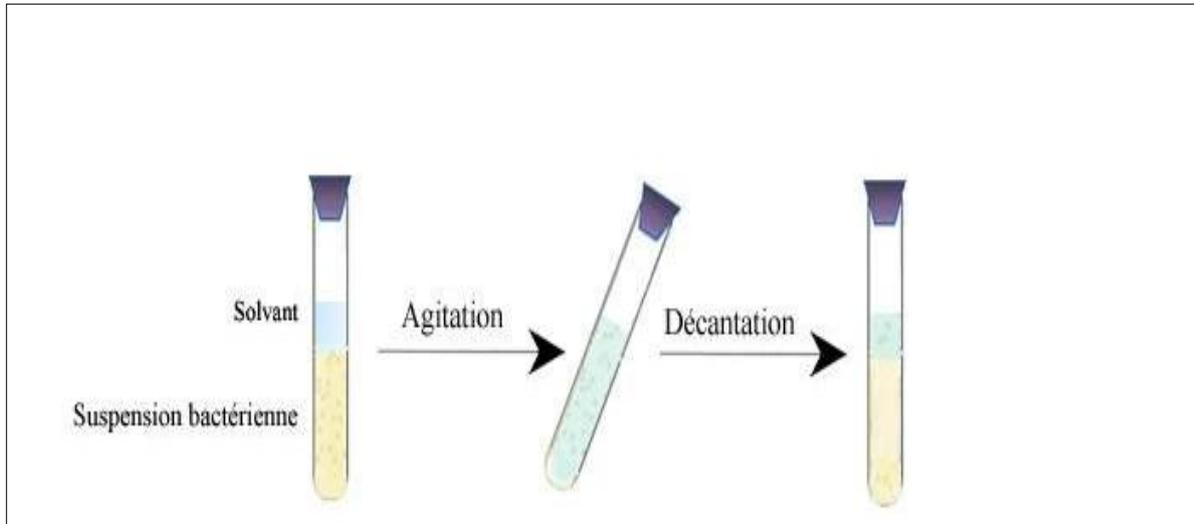


Figure 11. Présentation schématique du test BATH

2.3.2.1. Effet du pH sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'influence du pH, des cultures fraîches de *P. gingivalis* sont ensemencées la veille dans du milieu BHI-HK. Après la période d'incubation les cellules sont récoltées suite à une centrifugation, les culots obtenus sont lavés deux fois à l'aide d'un tampon PBS stérile dont le pH est ajusté à différentes valeurs (5,5; 6,5; 7 et 8,5) et resuspendus dans le même tampon à différent pH, les suspensions préparées sont traitées selon le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.2.2. Effet de la ménadione sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'effet de la ménadione, des cultures fraîche de *P. gingivalis* sont ensemencées la veille dans du milieu BHI-H en présence de concentrations croissantes (0; 0,5 et 1 $\mu\text{g/ml}$ final) de ménadione, les culots bactériens sont récupérés et l'expérience est réalisée solen le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.2.3. Effet de l'alpha-tocophérol sur l'hydrophobicité du *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'effet l'alpha-tocophérol, des cultures fraîches de *P. gingivalis* sont ensemencées la veille dans du milieu BHI-HK en présence de concentrations croissantes (50; 100 et 200 μM) d'alpha-tocophérol, les culots bactériens sont récupérés et l'expérience est réalisée solen le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.3. Adhésion microbienne aux solvants (MATS)

L'adhésion microbienne aux solvants, communément appelé MATS "Microbial Adhesion To Solvents" méthode mise au point par Bellon-Fontaine *et al.*, (1996). C'est une technique inspirée de la méthode d'adhésion aux hydrocarbures (MATH pour Microbial Adhesion To Hydrocarbon) (Rosenberg, 1980), et couramment employée pour déterminer l'hydrophobicité relative des cellules microbiennes, ainsi que leur caractère donneur/accepteur d'électrons (acide-base au sens de Lewis) (Bellon- Fontaine *et al.*, 1996).

Cette méthode est basée sur la comparaison de l'affinité d'une souche pour un solvant apolaire et un solvant monopolaire. Le solvant monopolaire peut être acide ou basique (au sens de Lewis), mais les deux solvants doivent posséder la même énergie libre de surface liée au caractère de Lifshitz-van der Waals (Tableau 2). Sur cette base, deux couples de solvants ont été choisis : le couple chloroforme (Sigma), solvant accepteur d'électrons/ hexadécane (Sigma) et le couple acétate d'éthyle (Sigma), solvant donneur d'électrons/ décane (Sigma).

Tableau 2. Composantes van der Waals (γ^{LW}), accepteur d'électrons (γ^+) et donneur d'électrons (γ^-) de l'énergie libre de surface des solvants utilisés pour le test MATS (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

Solvants	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)
Chloroforme	27,2	3,8	0
Hexadécane	27,2	0	0
Acétate d'éthyle	23,9	0	19,4
Décane	23,9	0	0

1,8 ml de la suspension bactérienne obtenue sont introduits dans un tube à essai et additionnés de 0,3 ml du solvant. Le mélange est agité au vortex pendant environs 2 minutes. Une séparation complète entre les phases organique et aqueuse est obtenue après une période de décantation de 20 minutes, la phase aqueuse est alors prélevée et une mesure de la densité optique à 600 nm est effectuée (A). Le pourcentage d'adhésion aux solvants est alors donné par la relation suivante:

$$\% \text{ Adhesion} = (A - A_0/A_0) \times 100$$

2.3.3.1. Effet du pH sur le caractère donneur/ accepteur d'électrons

Afin de déterminer l'effet du pH sur le caractère donneur/accepteur d'électrons des isolats de *P. gingivalis*, les cellules sont récoltées suite à une centrifugation des cultures fraîches en milieu BHI-HK. Les culots obtenus sont lavés deux fois à l'aide d'un tampon PBS stérile dont le pH est ajusté à différentes valeurs (5,5; 6,5; 7 et 8,5) et resuspendus dans le même tampon à différent pH. Les suspensions préparées sont traitées selon le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.3.2. Effet de la ménadione sur le caractère donneur/ accepteur d'électrons

Afin de déterminer l'effet de la ménadione sur le caractère donneur/accepteur d'électrons des isolats de *P. gingivalis*, des cultures fraîches en milieu BHI-H sont préparées en présence de concentrations croissantes (0; 0,5 et 1 µg/ml final) de ménadione. Les culots bactériens sont récupérés et les suspensions ainsi préparées sont traitées selon le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.3.3. Effet de l'alpha-tocophérol sur le caractère donneur/ accepteur d'électrons

Afin de déterminer l'effet de l'alpha-tocophérol sur le caractère donneur/accepteur d'électrons des isolats de *P. gingivalis*, des cultures fraîches en milieu BHI-HK sont préparées en présence de concentrations croissantes (50; 100 et 200 µM) d'alpha-tocopherol. Les culots bactériens sont récupérés et les suspensions ainsi préparées sont traitées selon le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.4. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur l'adhésion et la formation du biofilm de *P. gingivalis*

2.4.1. Préparation des suspensions bactériennes

A partir des cultures fraîches obtenues sur milieu d'isolement, des suspensions bactériennes sont préparées dans du milieu BHI-HK.

Les suspensions bactériennes préparées sont soigneusement homogénéisées, l'inoculum est ajusté à l'aide d'un spectrophotomètre jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,2 à 620 nm.

2.4.2. Adhésion et formation du biofilm sur microplaque

Des microplaques de 96 puits sont inoculées avec des suspensions bactériennes à raison de 200 µl par puit. Ces puits servent de support à l'adhésion et l'établissement du biofilm bactériens.

Afin de déterminer la capacité d'adhésion et de formation du biofilm les microplaques sont incubées pendant 4 h et 48 h respectivement à 37°C. Après incubation la biomasse fixée est quantifiée selon la méthode du cristal violet.

2.4.2.1. Effet du pH sur l'adhésion et la formation du biofilm du *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'influence du pH sur la capacité d'adhésion de *P. gingivalis*, des suspensions bactériennes à différents pH (5,5; 6,5; 7 et 8,5) sont aseptiquement préparées dans du milieu BHI-HK et ajustées à une DO de 0,2 à 620 nm.

200 µl de différentes suspensions bactériennes sont ensuite inoculées dans des microplaques de 96 puits. Celles-ci sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 4 heures.

Pour l'étude de la formation du biofilm, les microplaques sont inoculées avec les différentes suspensions préparées à raison de 200 µl par puit et sont ensuite incubées en anaérobiose pendant 48 heures.

La quantité de biomasse adhérente est proportionnelle à la quantité du cristal violet retenu dont l'absorbance est mesurée à 570 nm après chaque période d'incubation.

2.4.2.2. Effet de la ménadione sur l'adhésion et la formation du biofilm du *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'influence de la ménadione sur la capacité d'adhésion de *P. gingivalis*, des suspensions bactériennes sont aseptiquement préparées dans du milieu BHI-H en présence de concentrations croissantes (0 ; 0,5 et 1 µg/ml final) de ménadione et ajustées à une DO de 0,2 à 620 nm.

200 µl de différentes suspensions bactériennes sont introduites dans des microplaques de 96 puits. Celles-ci sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 4 heures.

Pour l'étude de la formation du biofilm, les microplaques sont inoculées avec les différentes suspensions préparées à raison de 200 µl par puit et sont ensuite incubées en anaérobiose pendant 48 heures.

La quantité de biomasse adhérente est proportionnelle à la quantité du cristal violet retenu dont l'absorbance est mesurée à 570 nm après chaque période d'incubation.

2.4.3. Quantification de la biomasse fixée

La biomasse fixée est quantifiée par coloration au cristal violet 1 %. En bref, la phase liquide (bactéries planctoniques) de chaque puit est débarrassée et ces derniers (puits) sont lavés trois fois à l'eau distillée. 200 µl de cristal violet sont alors ajoutés et les microplaques sont incubées à la température de la pièce pendant 45 minutes.

L'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois des puits à l'eau distillée, les microplaques sont incubées à 37°C. 200 µl d'une solution d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25) sont ajoutés dans chaque puit, dans le but de relarguer le cristal violet adsorbé par la biomasse fixée.

L'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

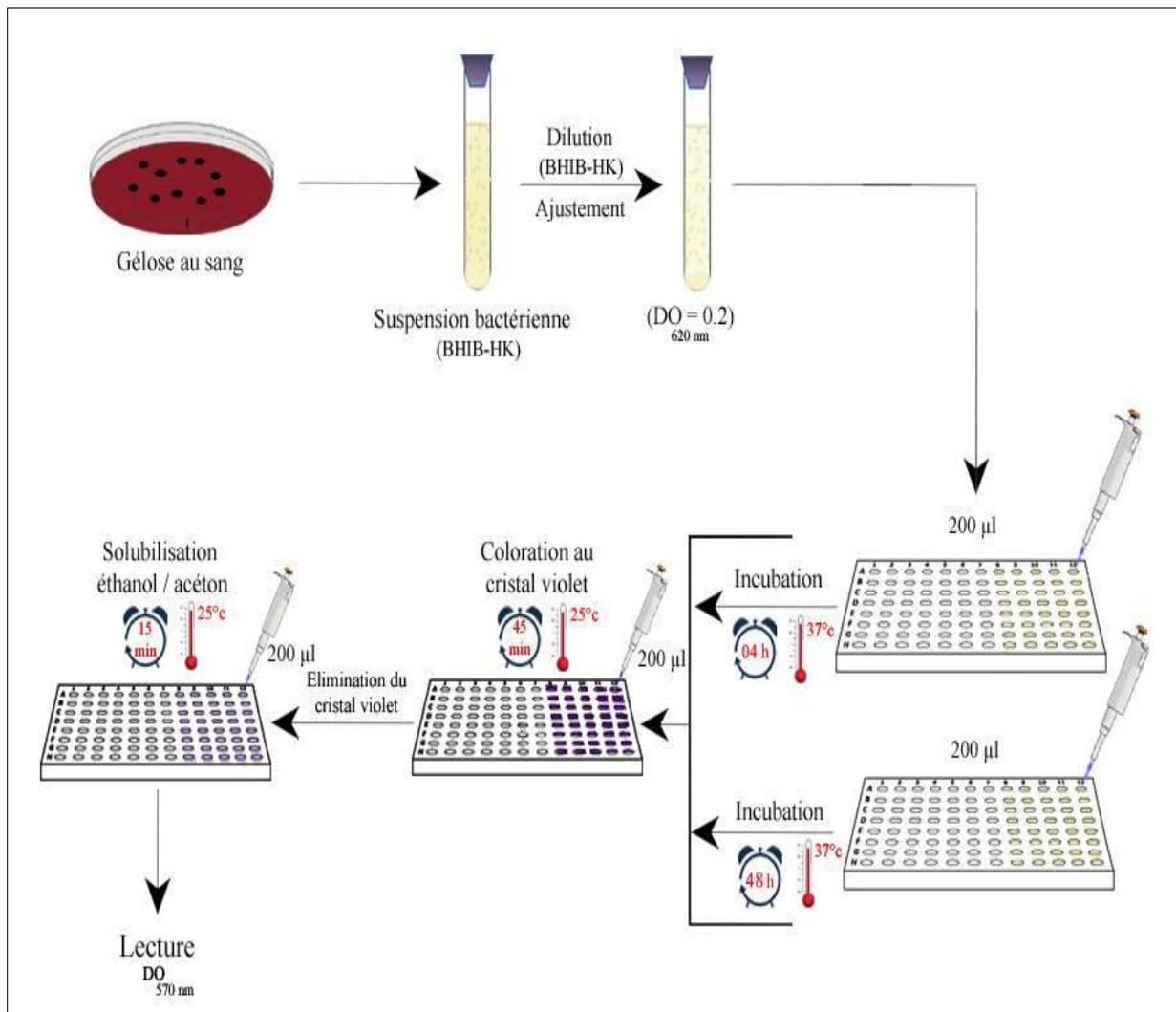


Figure 12. Présentation schématique des tests *in vitro* d'adhésion et de formation du biofilm.

2.5. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur les fibroblastes gingivaux stimulés avec le lipopolysaccharide de *P. gingivalis*.

2.5.1. Culture des cellules fibroblastiques gingivales

2.5.1.1. Milieu de culture utilisé

Le milieu utilisé est le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DME) additionné de 5% de sérum foetal bovin (FBS; Sigma-Aldrich) préalablement inactivé à la chaleur (60°C; 30 minutes.), la pénicilline 100 U/ml et la streptomycine 25 µg/ml (Sigma-Aldrich).

2.5.1.2. Isolement et culture des fibroblastes gingivaux

Les fibroblastes gingivaux sont amplifiés à partir de déchets opératoires de gencives provenant d'extractions dentaires ou lors d'une greffe de gencive.

Des biopsies de la muqueuse gingivale sont prélevées lors d'opérations chirurgicales effectuées à la clinique dentaire de la faculté de médecine dentaire de l'université Laval Canada sur des patients qui ne présentent aucune pathologie parodontale.

Afin de séparer l'épithélium de la lamina propria, les biopsies préalablement dilacérées au bistouri sont traitées avec la thermolysine à raison de 500 µg/ml.

L'isolement et la dissociation des fibroblastes gingivaux consistent à découper le plus finement possible la lamina propria. Cette dissociation mécanique est complétée par une digestion enzymatique en transférant les petits morceaux récupérés dans une solution de collagénase P à 0.125 U/ml (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada) pendant 45 minutes à 37°C.

Un rinçage de la collagénase est effectué en centrifugeant la suspension cellulaire. Le culot récupéré est repris dans du milieu de culture complet pour fibroblastes.

Les cellules ainsi isolées et individualisées sont mises en culture dans un flacon de culture de 75 cm² et incubées à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. Les cultures de fibroblastes sont utilisées lorsque la confluence atteint 90%.

2.5.1.3. Repiquage des cellules (Trypsination).

Lorsque le tapis cellulaire atteint la confluence, les cellules doivent être réensemencées à une plus faible densité. Cela correspond aux étapes de dissociation du tapis cellulaire au moyen d'enzyme, de lavage (centrifugation et reprise du culot) des cellules dissociées, puis de l'ensemencement de nouvelles boîtes de culture dans un milieu de culture complet.

Le tapis est rincé délicatement avec 2 ml de trypsine préchauffée en éliminant le milieu après chaque lavage. Le lavage est nécessaire afin d'éliminer les cellules mortes en suspension et le FBS, inhibiteur puissant de l'enzyme. Le tapis cellulaire reçoit dans un deuxième temps 5 ml de trypsine avant d'être incubé pendant 5 minutes à 37°C.

Après incubation, le décollement du tapis cellulaire du support et l'individualisation des cellules sont vérifiés sous microscope inversé. Dès que le décollement et l'individualisation se sont produits, l'action de la trypsine est arrêtée.

L'inactivation de la trypsine est effectuée par l'ajout de 5 ml du milieu de culture complet. Le culot est récupéré après une centrifugation pendant 10 minutes à 1200 rpm puis résuspendu dans du milieu de culture neuf. La suspension cellulaire est alors répartie dans les boîtes de culture selon la densité désirée.

2.5.1.4. Numération

10 µl de la suspension cellulaire sont transférés dans un tube à hémolyse stérile afin de réaliser une numération en présence de 10 µl de bleu Trypan (concentration finale: 0,2%) sur cellule de Malassez.

2.5.2. Préparation du lyopolysaccharide de *P. gingivalis*

L'isolement du LPS de *P. gingivalis* (ATCC 33277) est réalisé par la méthode décrite précédemment par Darveau et Hancock (1983). Les principes de digestion des protéines cellulaires au moyen de la protéinase K est à la base de cette méthode.

Le degré de pureté du LPS obtenu (absence des protéines contaminantes) est confirmé par un dosage des protéines dans la préparation au moyen d'une trousse commerciale (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) avec l'utilisation de l'albumine sérique de bœuf comme contrôle. Les stocks du LPS lyophilisés sont entreposés à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation.

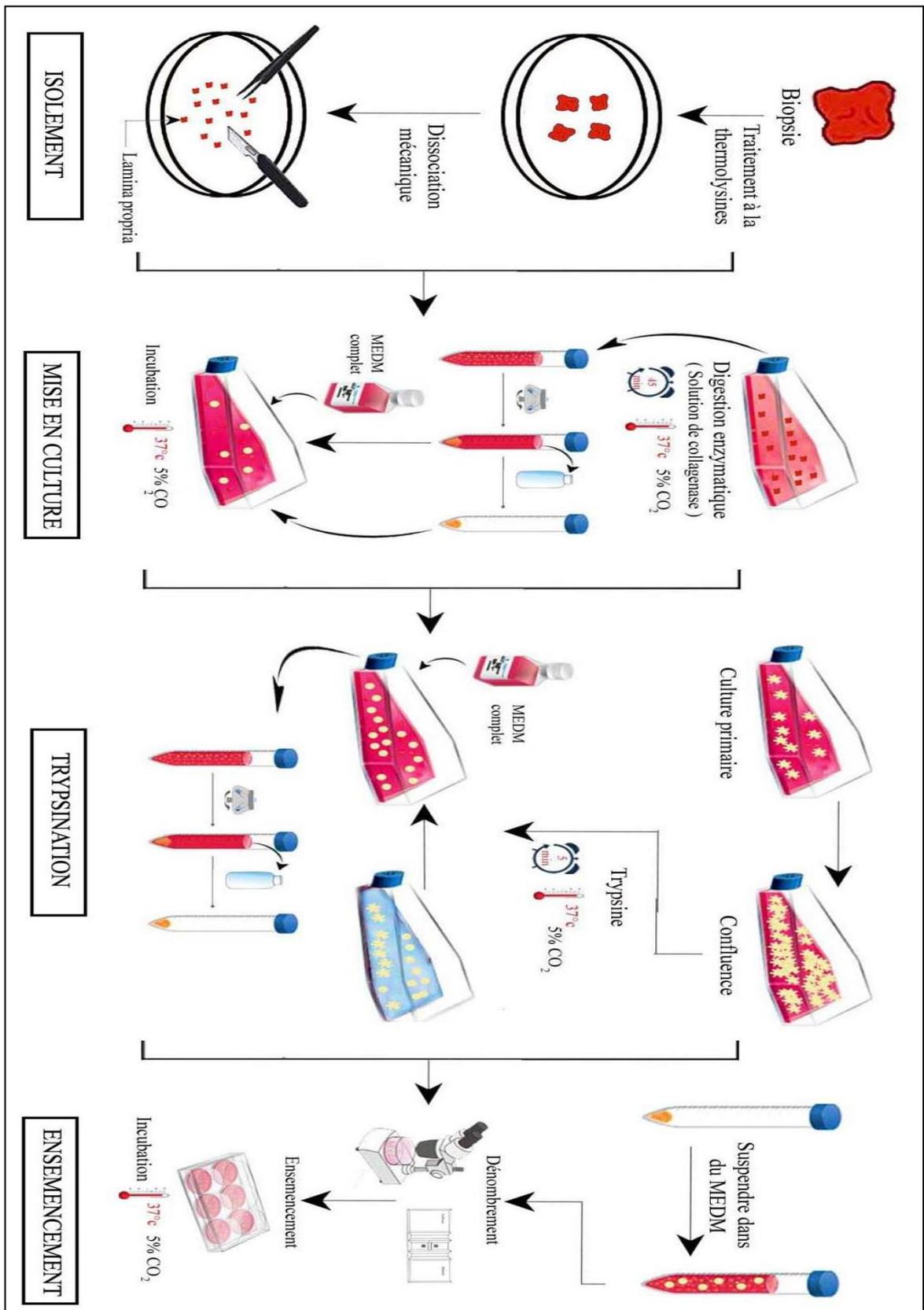


Figure 13. Présentation schématique du protocole expérimental de la culture des fibroblastes gingivaux.

2.5.3. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des cellules fibroblastiques stimulées ou non avec le LPS de *P. gingivalis*

2.5.3.1. Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des cellules fibroblastiques non stimulées avec le LPS de *P. gingivalis*

Les fibroblastes sontensemencés à une densité de 2×10^4 cellules par puit dans des boites de culture de six puits et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. Ensuite les cultures sont mises en contact avec de l'alpha-tocophérol à des concentrations croissantes (50, 100 et 200 µM) puis incubées pendant 24 h et 48 h.

Après chaque période d'incubation, les cellules fibroblastiques sont soigneusement lavées avec du PBS puis colorées au cristal violet (1%) à raison de 1 ml par puit. Les plaques sont incubées à la température de la pièce pendant 15 minutes. Après incubation, l'excès du colorant est éliminé puis les plaques sont soigneusement lavées à l'eau déminéralisée. Après séchage, les cultures cellulaires sont observées puis photographiées à l'aide d'un microscope inversé.

2.5.3.2. Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des cellules fibroblastiques stimulées avec le LPS de *P. gingivalis*

Les fibroblastes sontensemencés à raison de 2×10^4 cellules par puit dans des boites de culture de six puits et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. L'alpha-tocophérol est ensuite ajouté aux fibroblastes à des concentrations croissantes (50, 100 et 200 µM) pour un pré-traitement de 2 heures. Les cellules sont ensuite stimulées avec le LPS de *P. gingivalis* (1 µg/ml) puis incubées pendant 24 h et 48 h.

Après chaque période d'incubation, les cellules fibroblastiques sont soigneusement lavées avec du PBS puis colorées au cristal violet (1%) à raison de 1 ml par puit. Les plaques sont incubées à la température de la pièce pendant 15 minutes. Après incubation, l'excès du colorant est éliminé puis les plaques sont soigneusement lavées à l'eau déminéralisée. Après séchage, les cultures cellulaires sont observées puis photographiées à l'aide d'un microscope inversé.

2.5.4. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance des fibroblastes stimulés ou non avec le LPS de *P. gingivalis* (mesure de l'activité mitochondriale des cellules vivantes)

2.5.4.1. Effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance des fibroblastes non stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*.

Les fibroblastes sontensemencés à raison de 2×10^4 cellules par puit dans des boites de culture de six puits et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. Ensuite les cultures sont mise en contact avec de l'alpha-tocophérol à des concentrations croissantes (50, 100 et 200 µM) puis incubées pendant 24 h et 48 h.

La croissance cellulaire est évaluée après chaque période de culture à l'aide de l'essai de réduction du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium).

Ce test est basé sur la capacité de la déshydrogénase mitochondriale (NADH⁺) des cellules viables à réduire le MTT de couleur jaune, en cristaux de formazan pourpres, ce qui est mesuré par quantification spectrophotométrique à 570 nm après son dissolution dans l'isopropanol. La densité optique est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

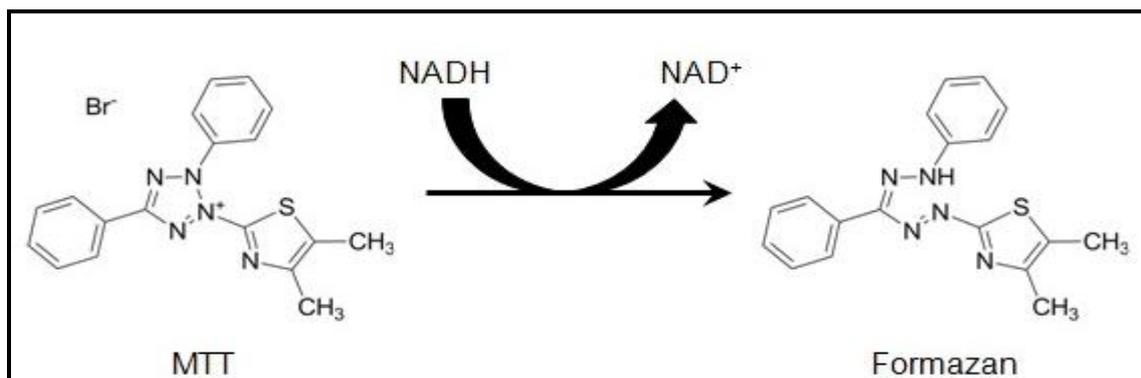


Figure 14. Principe de la réaction de réduction du MTT (Riss *et al.*, 2013).

La solution stock de MTT (Sigma-Aldrich) est préparée dans du PBS à une concentration de 5 mg/ml, puis filtrée. Après chaque période d'incubation, le milieu de culture est éliminé puis remplacé par 2 ml de milieu de culture additionné de 200 µl de MTT dissous dans du PBS.

Après 4 heures d'incubation à 37°C à l'obscurité, 2 ml d'isopropanol-HCl 0.04 N sont additionnés puis les cultures sont incubées pendant 30 minutes à 37°C à l'obscurité.

Enfin, 200 µl de la solution obtenue dans chaque puit sont prélevés puis disposés dans une plaque 96 puits. Les changements colorimétriques sont mesurés à 550 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Model 680; Bio-Rad Laboratories).

2.5.4.2. Effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance des fibroblastes stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*

Les fibroblastes sont ensemencés à raison de 2×10^4 cellules par puit dans des boîtes de culture de six puits et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. L'alpha-tocophérol est ensuite ajouté aux fibroblastes à des concentrations croissantes (50, 100 et 200 µM) pour un pré-traitement de 2 heures. Les cellules sont ensuite stimulées avec le LPS de *P. gingivalis* (1 µg/ml) puis incubées pendant 24 h et 48 h. La croissance est évaluée en réalisant l'essai de MTT précédemment décrit.

2.5.5. Mesure des cytokines et des peptides antimicrobiens après le contact des fibroblastes gingivaux avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis*.

Les fibroblastes sont ensemencés à une densité de 2×10^4 cellules par puit et incubés pendant 24 heures. Ensuite l'alpha-tocophérol est ajouté aux cellules fibroblastiques à des concentrations croissantes (50, 100 et 200 µM) pour un pré-traitement de 2 heures puis les cellules sont stimulées avec le LPS de *P. gingivalis* (1 µg/ml).

48 heures après le début de la stimulation avec le LPS, les surnageants de chaque condition de culture sont récupérés dans des tubes contenant 1 µl de cocktail inhibiteur de protéase (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) et immédiatement filtrés en utilisant des filtres de 0.22 µm.

Les surnageants obtenus sont analysés par la technique d'ELISA sandwich (enzyme linked immunosorbent assay) afin de déterminer les taux des peptides antimicrobiens (HBD-1 et HBD-2) et de cytokines (IL-1β et IL-6) sécrétés.

Les interleukines (IL-1β et IL-6) et les beta-défensines (HBD-1 et HBD-2) ont été dosés au moyen d'un kit ELISA selon les instructions du fabricant (R&D System, Minneapolis, MN) et (Peprotech, Rocky Hill, NJ) respectivement (Annexe 4). Les plaques ont été lues à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Model 680; Bio-Rad Laboratories). Les concentrations détectables minimales étaient de 1 pg/ml pour l'IL-1β, 0,7 pg/ml pour l'IL-6, 4 pg/ml pour HBD-1 et 16 pg/ml pour HBD-2 comme indiqué par le fabricant.

Les expériences ont été répétées quatre fois et les moyennes ± SD ont été calculées. Les résultats sont présentés comme étant les niveaux de cytokines ou de β-défensines par mg de

protéines totales extraites des mêmes cultures cellulaires. En effet, après la collecte des surnageants, les cellules adhérentes dans les boîtes de culture ont été d'abord détachées par l'ajout de trypsine puis centrifugées pendant 10 minutes à 270 g. Les culots récupérés sont remis en suspension dans 300 µl de tampon de lyse cellulaire (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) et incubés à 4 °C pendant 5 minutes, puis déposés pendant 10 minutes dans une microfuge froide. Les surnageants sont utilisés pour doser la concentration totale en protéines à l'aide de la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

2.5.6. Migration des fibroblastes gingivaux «scratch test»

La migration est évaluée par la capacité des cellules à recouvrir la blessure faite dans la monocouche confluente, communément nommée le «scratch test». Les fibroblastes gingivaux sontensemencés à une densité de 2×10^4 cellules par puit, en absence ou en présence de concentrations croissantes d'alpha-tocophérol (50,100 et 200 µM) avec ou sans stimulation avec le LPS de *P. gingivalis* (1 µg/ml) et incubés jusqu'à confluence.

A l'aide d'un cône de prélèvement stérile de 200 µl, des brèches sont faites dans la monocouche avec l'extrémité pointue du cône de prélèvement.

La plaie créée est d'une largeur approximativement entre 0,44 et 0,50 mm. Les cultures ont été rafraîchies avec un milieu de culture neuf et maintenues sous incubation.

Des photographies numériques de chaque plaie ont été prises à l'aide d'un Coolpix 950; Nikon Canada, Montréal, QC, Canada) à différentes périodes après avoir fait la brèche. Les images sont évaluées à l'aide des logiciels ImageJ (NIH) afin de mesurer la surface relative parcourue par les cellules fibroblastiques. L'expérience est répétée six fois et les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de la zone cicatrisée après 12, 24 et 48 heures par rapport à la zone de la plaie initiale (à temps zéro).

2.5.7. Analyses statistiques

Les résultats présentés correspondent à la moyenne d'au moins quatre expériences indépendantes \pm SD.

Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du test t de Student et l'ANOVA one-way. Une valeur p inférieure ou égale à 0.05 est considérée comme statistiquement significative.