

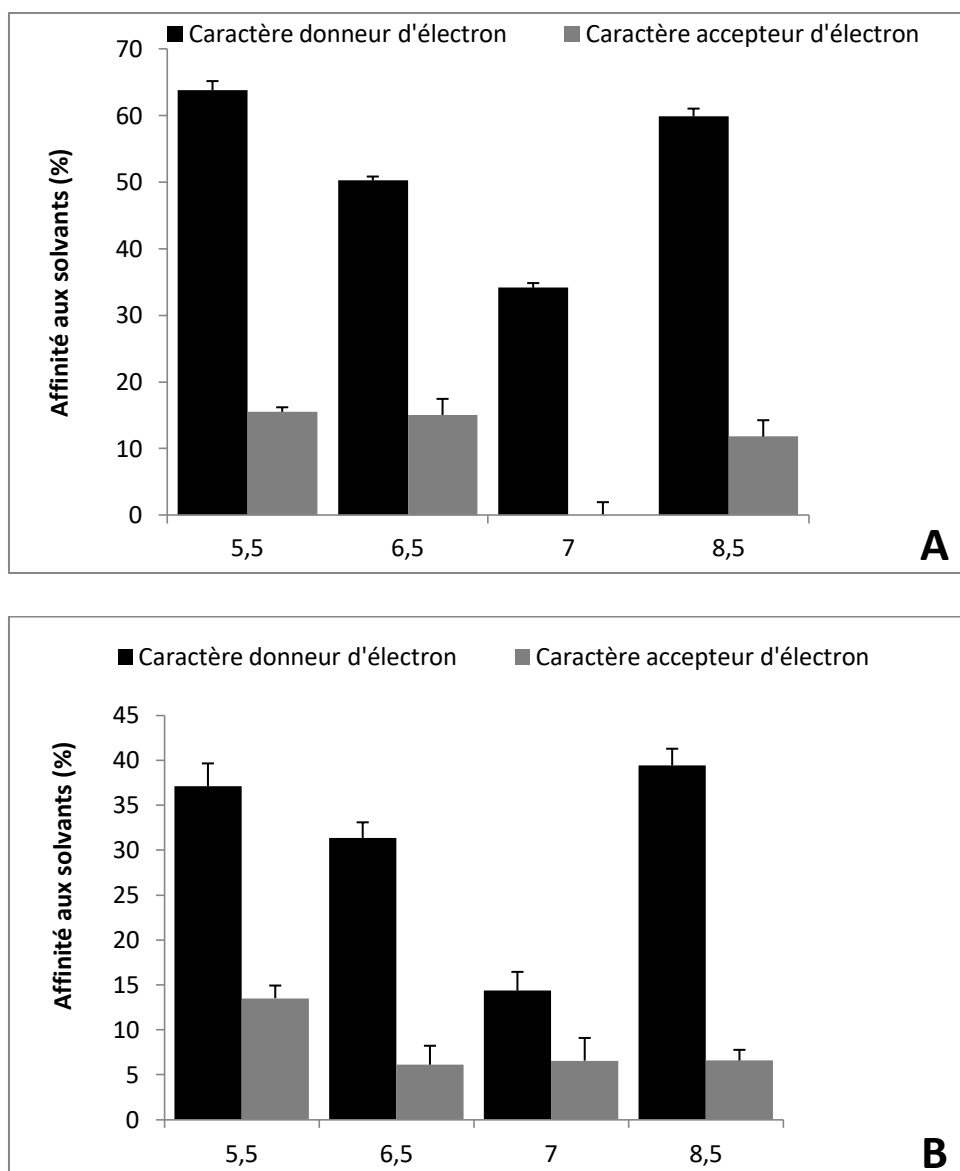


Figure 24. Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de *P. gingivalis* en fonction du pH.

Quel que soit le pH, les isolats semblent présenter un fort caractère donneur d'électrons prononcé du fait de leur affinité marquée au chloroforme qu'à l'hexadécane (solvant apolaire) avec un taux d'adhésion compris entre 65 et 88%. Pour des pH de 5.5 et 8.5, un maximum de caractère basique au sens de Lewis est observé, où une plus grande affinité au chloroforme a été constatée.

Des résultats similaires ont été révélés avec *S. aureus*, où une nette augmentation est notée dans les deux pH limites; acide (pH 3) et basique (pH 11) (Hamadi *et al.*, 2004).

Boutaleb, (2007) a montré que chez la bactérie *P. aeruginosa*, une diminution du caractère donneur d'électrons a été remarquée avec l'augmentation du pH. Les modifications du

caractère donneur d'électrons de la bactérie découlent nécessairement du déplacement des équilibres de protonation /déprotonation des groupement basiques.

Le caractère donneur doit se révéler important si les groupements, de type COO^- sont déprotonés, à pH neutre ou alcalin (Boutaleb, 2007; Djeribi *et al.*, 2013) du fait que la déprotonation de divers groupements augmentent avec l'augmentation du pH (Briandet *et al.*, 1999; Djeribi *et al.*, 2013). Cependant les souches isolées pour cette étude exhibent un comportement différent vis-à-vis de la variation du pH. En effet, une diminution de ce caractère a été notée à des pH variant de 5,5 à 7. Des résultats similaires ont été démontrés par l'étude de Djeribi *et al.*, (2013) sur *Acinetobacter baumannii*.

Quant au caractère accepteur d'électron, ce dernier est estimé par la différence entre le pourcentage d'adhésion à l'acétate d'éthyle et celui du décane (solvant apolaire), mais seulement les valeurs positives ont été prises en considération.

Comme mentionné dans le tableau 8, l'affinité est plus élevée avec l'acétate d'éthyle qu'avec le décane pour tous les pH, ce qui indique la présence du caractère accepteur d'électron. Ce caractère peut être attribué à la présence de groupements acides (Rubio, 2002; Djeribi *et al.*, 2013) ou aux charges négatives exposées à la surface cellulaire (Bergeron *et al.*, 2009).

Néanmoins ce caractère est relativement faible en comparaison avec le caractère donneur d'électron des deux souches. Il est à noter qu'à pH 7, le caractère Lewis-acide a été négligeable pour une des deux souches testées. Certaines études ont estimé le caractère acide-base de la surface des cellules microbiennes à pH neutre. Celles-ci, ont révélé que la surface des cellules présente un caractère fortement donneur et faiblement accepteur d'électrons. Ceci étant particulièrement net pour la souche *P. aeruginosa*. (Pelletier *et al.*, 1997; Hamadi *et al.*, 2004).

Nous pouvons constater selon les résultats mentionnés dans le tableau 8 que le caractère donneur d'électrons de la surface de *P. gingivalis* est significativement plus élevé que le caractère accepteur d'électron. Ces résultats indiquent donc une basicité de la surface.

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

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 9 et illustrés par la figure 25, il apparaît que les deux souches cultivées en absence et en présence de différentes concentrations en ménadione présentaient plus de caractère donneur d'électron. Ce résultat est révélé par une affinité supérieur au chloroforme (solvant accepteur d'électrons) qu'à l'hexadécane (solvant

apolaire). Cependant le caractère (Lewis-base) semble diminuer avec l'augmentation de la concentration en ménadione.

En ce qui concerne le caractère accepteur d'électron, les pourcentages d'affinité à l'acétate d'éthyle indiquent un caractère Lewis-acide relativement faible. Il à noter qu'en présence de 0,5 µg/ml de ménadione les surfaces bactériennes montrent un caractère accepteur d'électron plus marqué, bien qu'il reste relativement réduit en comparaison avec le caractère donneur d'électron.

Tableau 9. Résultats du test MATS en fonction de la ménadione.

Ménadione (µg/ml)		Affinité aux solvants (%)			
		Chloroforme	Hexadécane	Acétate d'éthyle	Décane
Souche A	0	72,28±3,18	31,19±1,95	49,38±2,46	40,16±0,69
	0,5	50,9±0,85	13,71±2,11	31,6±2,69	16,23±0,74
	1	83,99±1,29	49,38±1,23	39,23±2,03	38,02±1,61
Souche B	0	85,83 ±1,90	27,08±0,72	29,59±0,56	25,12±0,54
	0,5	67,88±1,86	23,57±0,70	41,74±0,97	23,17±1,21
	1	90,24±1,25	53,13±2,33	50,52±0,67	45,41±1,44

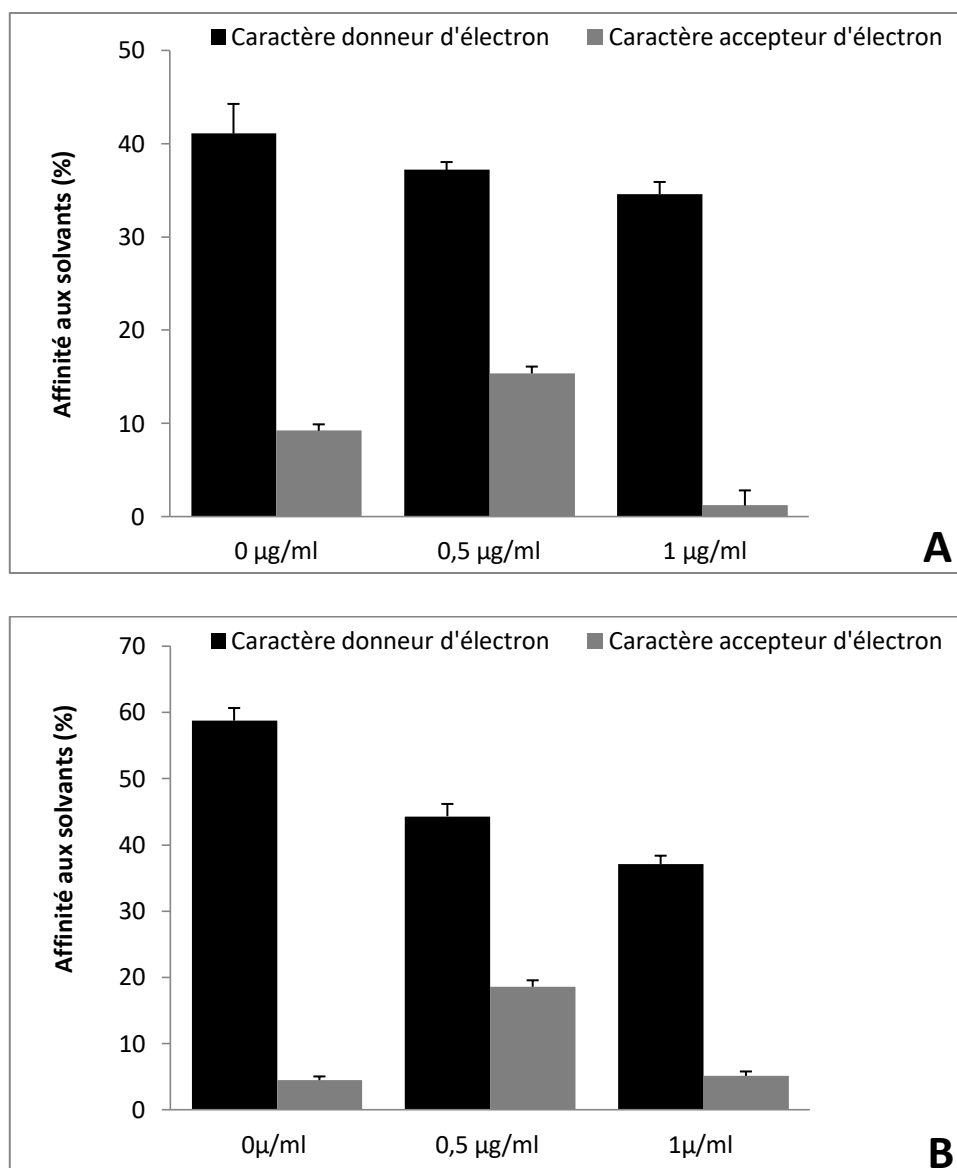


Figure 25. Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de *P. gingivalis* en fonction de la ménadione.

Les bactéries sont capables de modifier leurs propriétés en fonction de leur environnement en adaptant leur métabolisme et leur composition membranaire, et par conséquent leurs propriétés physico-chimiques de surface.

Au cours des travaux de (El Gghmari *et al.*, 2002; Hamadi *et al.*, 2008; Hamadi *et al.*, 2009) réalisés sur la relation entre les propriétés physico-chimiques et la composition chimique de surface, il a été rapporté que chaque propriété est engendrée par des éléments chimiques particuliers.

La prédominance du caractère donneur d'électrons peut constituer une indication sur la nature des groupements chimiques exposés, puisque l'importance du caractère donneur d'électrons

est attribué aux groupements chimiques généralement chargés négativement ou neutres, comme les groupements carboxylates (COO^-), les groupements amine (NH_2) et phosphate (PO_4^-) des phospholipides, lipoprotéines et les lipopolysaccharides (Briandet *et al.*, 1999; Rubio, 2002; Hamadi *et al.*, 2004; Polak-Berecka *et al.*, 2014). Le caractère accepteur d'électrons est généralement attribué aux groupements acides comme RNH^+_3 (Rubio, 2002).

Cependant, ces propriétés ne sont pas « figées » et peuvent évoluer en fonction de l'environnement physique et chimique des micro-organismes.

Certaines études ont évalué l'effet que pourraient apporter les conditions stressante de culture sur les propriétés acide-base au sens de Lewis, Bereksi *et al.*, (2002) ont montré que l'ajout du NaCl dans le milieu de culture affecte les propriétés physico-chimiques de surface de *L. monocytogenes*.

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

L'analyse des résultats mentionnés dans le tableau 10 et illustrés par la figure 26, permet de dresser le constat suivant : La surface des deux souches de *P. gingivalis* présente une légère diminution du caractère donneur d'électron à la concentration de 50 μM d'alpha-tocophérol. Puis à des concentrations de 100 μM et 200 μM . Ce caractère augmente d'une manière significative. Il est à noter que pour toutes les concentrations en vitamine E, une forte affinité au chloroforme qu'à l'hexadécane a été observée. Ce qui indique la dominance du caractère basique au sens de Lewis.

Quant au caractère accepteur d'électron, il, s'est maintenu presque constant et relativement faible pour les différentes concentrations d'alpha-tocophérol testées. Il a été révélé par des pourcentages d'affinité à l'acétate d'éthyle très proches.

Tableau 10. Résultats du test MATS en fonction de l'alpha-tocophérol.

Alpha-tocophérol (μM)	Affinité aux solvants (%)			
	Chloroforme	Hexadécane	Acétate d'éthyle	Décane
Ctrl	82,51 $\pm$ 1,12	49,38 $\pm$ 0,99	37,9 $\pm$ 0,44	37,48 $\pm$ 2,50
50	75,58 $\pm$ 1,33	44,61 $\pm$ 1,44	47,91 $\pm$ 1,90	31,66 $\pm$ 0,38
Souche				

A	100	85,94±1,39	39,16±1,44	58,23±1,84	41,8±0,75
	200	88,33±0,72	40,7±1,25	54,75±2,83	37,35±2,38
	Ctrl	79,79±1,06	51,21±2,11	50,85±1,99	43,49±1,66
Souche	50	58,36±1,39	33,25±0,67	38,99±1,88	34,13±2,44
B	100	60,41±1,90	25,41±1,44	33,75±2,03	28,08±0
	200	64,51±1,50	30,52±0,69	30,35±1,15	24,49±1,84

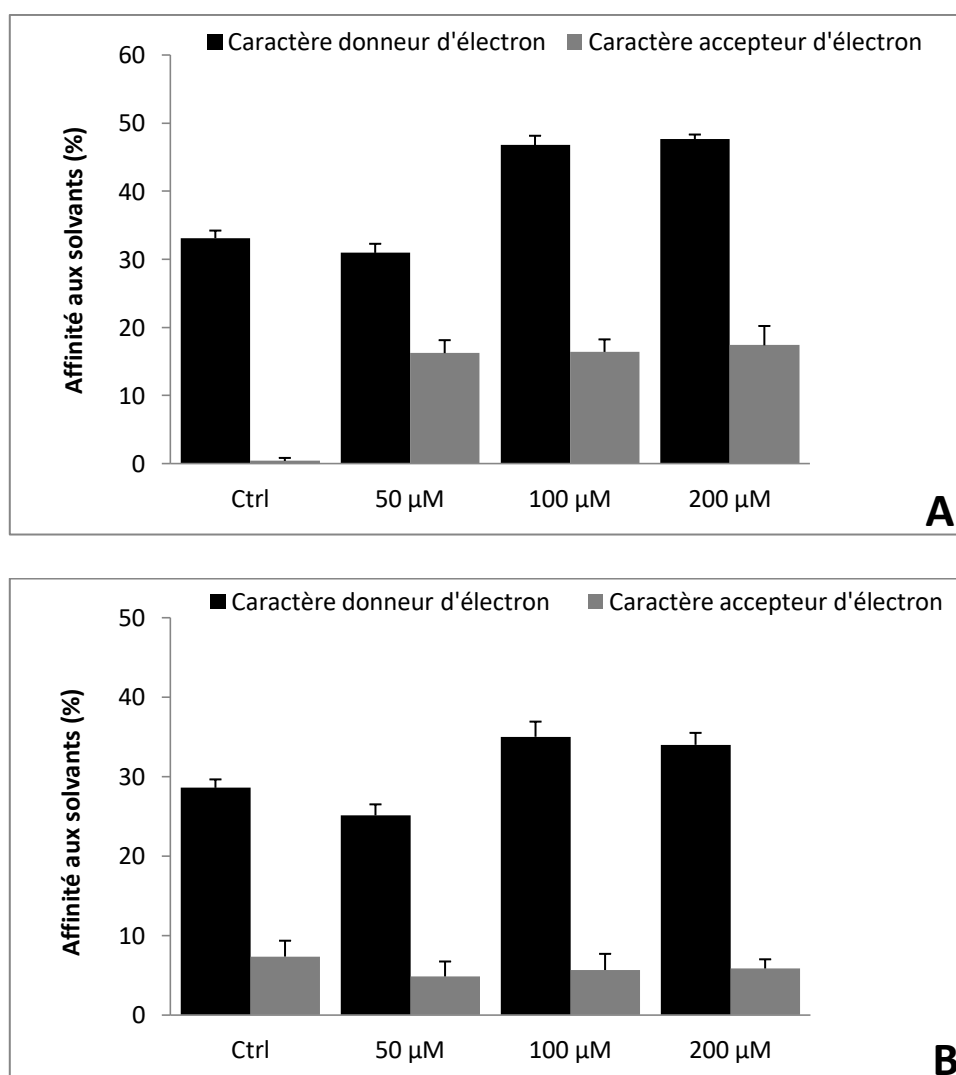


Figure 26. Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de *P. gingivalis* en fonction de l'alpha-tocophérol.

Aucune explication ne peut être fournie afin d'expliquer l'évolution du caractère acide-base de Lewis révélée par les isolats de *P. gingivalis*. Sachant que tout caractère reste dépendant de la souche bactérienne considérée, Boutaleb, (2007) soupçonne que ce comportement pourrait découler d'une certaine réactivité des groupements acides présents à la surface cellulaire avec ceux basiques du fait de la nette prépondérance du caractère donneur d'électrons sur celui d'accepteur.

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

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

Lors de l'adhésion et l'établissement du biofilm, les cellules bactériennes demeurent sensibles aux changements environnementaux, elles doivent être en mesure de maintenir un équilibre approprié entre le passage de l'état planctonique au biofilm. Un processus qui fait impliquer l'interaction de divers facteurs cellulaires bactériens (Lo *et al.*, 2010). Ces interactions peuvent être modifiées par le changements de pH et des forces ioniques (Hirose *et al.*, 1996).

Des tests d'adhésion ont donc été réalisés dans ce sens. Les résultats sont donnés en ratio par rapport aux puits témoins (BIHB-HK sans bactéries) afin de s'affranchir de la coloration non spécifique de la surface des puits des microplaques par le cristal violet. Il est admis, arbitrairement, qu'une souche adhère lorsque le ratio est supérieur à 2, ce qui veut dire que l'absorbance est 2 fois supérieure par rapport aux puits témoins.

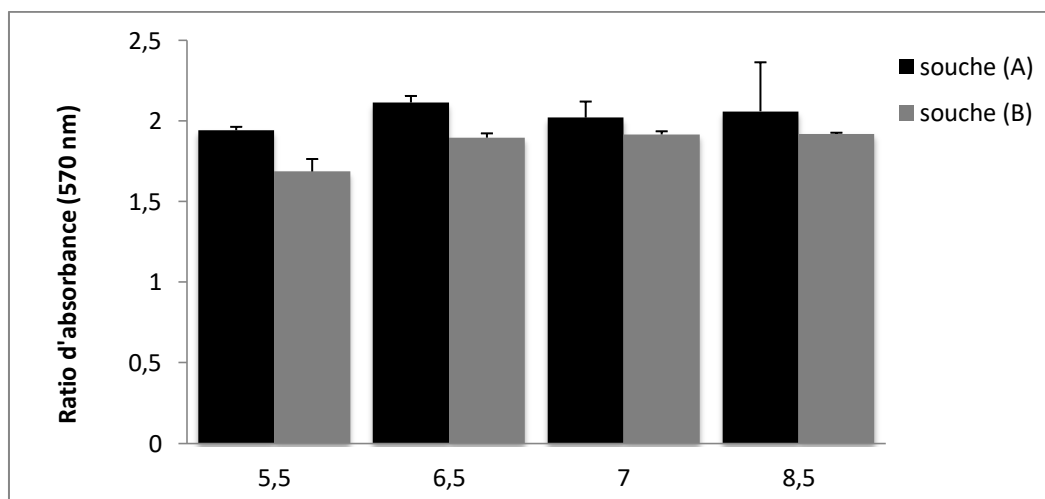


Figure 27. Détermination de l'effet du pH sur la capacité d'adhésion de *P. gingivalis*.

La densité bactérienne adhérente sous l'influence des différentes valeurs de pH, révèle une adhésion proche pour des pH de 6,5, 7 et 8,5 tandis qu'à pH 5,5 la capacité d'adhésion est relativement moindre (figure 27).

Une adhérence stable de *P. gingivalis* aux cellules épithéliales gingivales humaines a été observée à des niveaux de pH compris entre 6,5 et 8,0, avec une adhérence maximale obtenue à pH 7,5. (Mori *et al.*, 1998). Hirose et collaborateurs, (1996) ont montré l'élévation de la capacité d'adhésion de *P. gingivalis* aux cellules gingivales humaines lors du passage d'un pH de 7 à 8.

De plus, l'expression des fimbriae de *P. gingivalis* peut être régulée par les conditions environnementales. Ces molécules sont impliquées dans l'adhésion aux composants revêtant la cavité buccale, telles que les cellules parodontales et par conséquent induisant la formation du biofilm au niveau de parodonte (Kato *et al.*, 2007). D'après Mori *et al.*, (1998) une synthèse protéique fimbriale élevée a été observée à pH 7,5. Ces résultats indiquent que le pH de l'environnement régule la croissance, l'adhésion de *P. gingivalis* et l'expression des fimbriae. Ils suggèrent également que le pH de la poche parodontale augmente pendant la réponse inflammatoire de l'hôte et que la synthèse des fimbriae augmente nettement.

En outre, les travaux de (Kontani *et al.*, 1996) ont révélé une augmentation significative de l'attachement des fimbriae de *P. gingivalis* aux monocouches fibroblastiques traitées avec les gingipaines. Ces derniers participent au démasquage des récepteurs au niveau des sites sous-gingivaux. Selon les essais de Tenorio *et al.*, (2011), une diminution de l'activité des gingipaines a été notée sous l'effet des acides organiques.

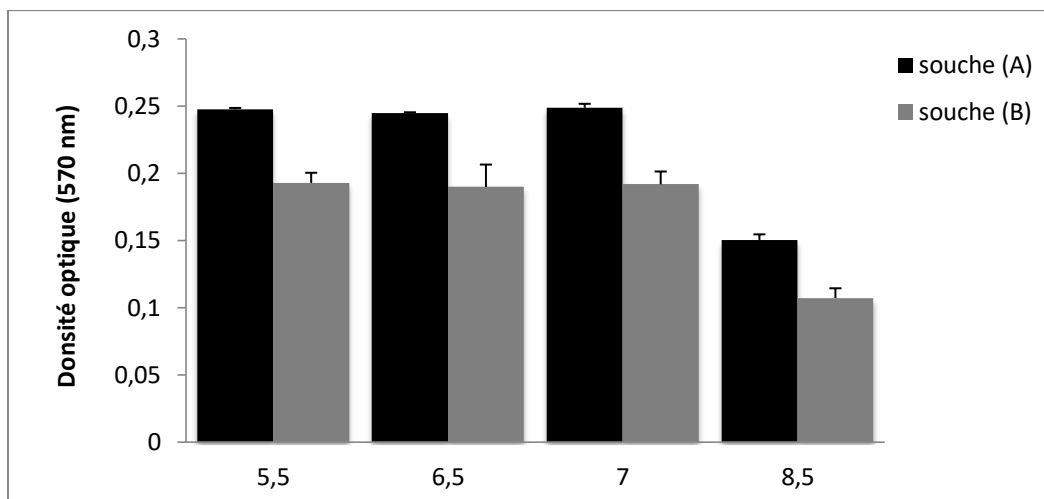


Figure 28. Détermination de l'effet du pH sur la formation du biofilm de *P. gingivalis*.

Les interactions métaboliques peuvent modifier le microenvironnement local (Takahashi, 2003). Certains travaux ont démontré l'effet du pH sur les biofilms de la plaque dentaire et ceux des voies urinaires (Jones *et al.*, 2014). L'effet du pH sur la formation du biofilm par *P. gingivalis* a été évalué dans le milieu BHI-HK.

Les résultats illustrés par la figure 28 montrent que les milieux de culture dont le pH variant de 5,5 à 7, n'influencent aucunement la formation du biofilm de *P. gingivalis*. Ce constat est révélé par des taux d'adhérence approximativement similaires.

A un pH de 8, il est possible d'observer une réduction très significative du pouvoir de formation du biofilm chez les deux souches. Elles présentaient une capacité de plus de 50% moindre. D'après l'étude de Zmantar *et al.*, (2010) la production de biofilm dépend de la valeur du pH du milieu. A des niveaux très acides (pH 3) et alcalins (pH 12), la formation du biofilm était faible tandis qu'à pH 7, elle s'est révélée modérée.

Par contre, l'étude de Hostackà *et al.*, (2010) menée sur l'estimation de la production quantitative du biofilms par *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Vibrio cholerae* sous l'effet du pH, montre que l'élévation du pH est associée à une augmentation de la production du biofilm par tous les microorganismes étudiés. Une production du biofilm significativement plus élevée a été observée à pH 7.5 et 8.5 par rapport au pH 5,5.

3.4.2. Effet de la ménadione sur la capacité d'adhésion et la formation du biofilm de *P. gingivalis*

Les figures 29 et 30 illustrent respectivement l'évolution de la capacité d'adhésion et du pouvoir de formation du biofilm de *P. gingivalis* cultivé en condition limitante en ménadione ou en présence de cette molécule (0,5 µg/ml et 1 µg/ml). D'après ces résultats, il est possible d'observer qu'il n'existe pratiquement pas de différences significatives. Les taux d'absorbance demeurent approximativement inchangés, indiquant ainsi que la vitamine K n'exerce pas un effet marquant sur les isolats.

Toutefois, nous observons qu'une des souches est plus adhérente et plus formatrice de biofilm tout en notant que l'évolution de l'adhésion est semblable pour les deux souches isolées.

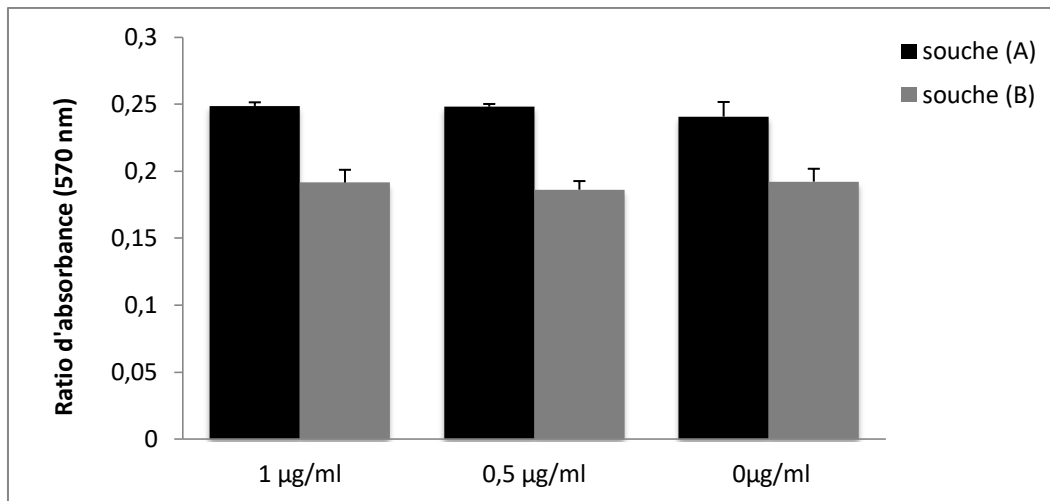


Figure 29. Détermination de l'effet de la ménadione sur la capacité d'adhésion de *P. gingivalis*.

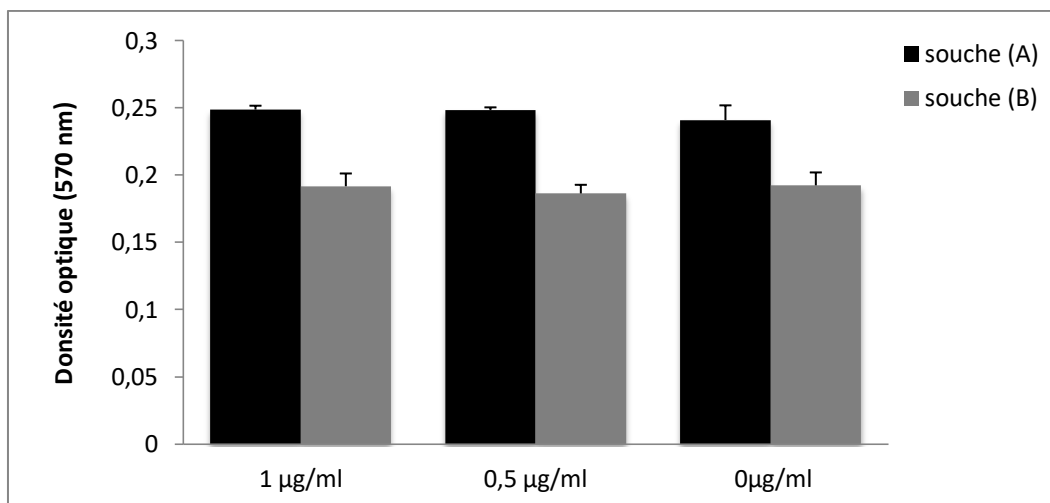


Figure 30. Détermination de l'effet de la ménadione sur la formation du biofilm de *P. gingivalis*.

A notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'évaluation de la l'adhésion et la formation du biofilm par *P. gingivalis* en limitation de ménadione. Tandis que le rôle de cette vitamine en tant que facteur de croissance fourni par les bactéries résidentes du biofilm dentaire notamment *Veillonella sp* a été démontré (Simon *et al.*, 2012; Izumi *et al.*, 2015).

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

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

Afin de déterminer l'effet de l'alpha-tocophérol sur l'attachement et la morphologie cellulaire, les fibroblastes gingivaux sont cultivés en présence de diverses concentrations (50, 100 et 200 μ M) de la vitamine pendant 24 et 48 heures. Les résultats obtenus révèlent qu'aucun effet notable n'a été observé jusqu'à une concentration de 200 μ M (figure 32). Les fibroblastes ont été allongés avec un noyau dense et une petite quantité de cytoplasme.

En présence de LPS de *P. gingivalis* (1 μ g/ml), aucun effet inverse de l'alpha-tocophérol sur l'adhérence et la morphologie des fibroblastes n'a été observé (figure 33). A l'inverse, les cellules fibroblastiques normales de poumon présentait des changements morphologiques modérés telles que la formation de petites vésicules et des extensions cytoplasmiques suit au traitement avec l'alpha-, gamma- et delta-tocotriénol, des isoformes d'origine naturelle de la vitamine E (Lim *et al.*, 2014).

En outre, la vitamine E est connue pour son rôle protecteur de la membrane cellulaire, qui à son tour, assure la stabilité de la cellule (Rizvi *et al.*, 2014). Des essais *in vitro* réalisés sur culture cellulaire, ont montré des changements morphologiques uniformes dans les cellules tumorales après leur contact avec la vitamine E (Schwartz et Shklar, 1992).

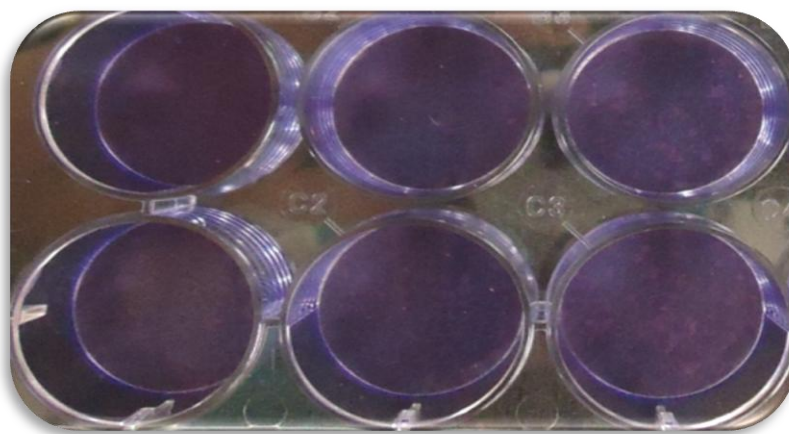


Figure 31. Observation macroscopique des tapis cellulaires des fibroblastes gingivaux colorés au cristal violet.

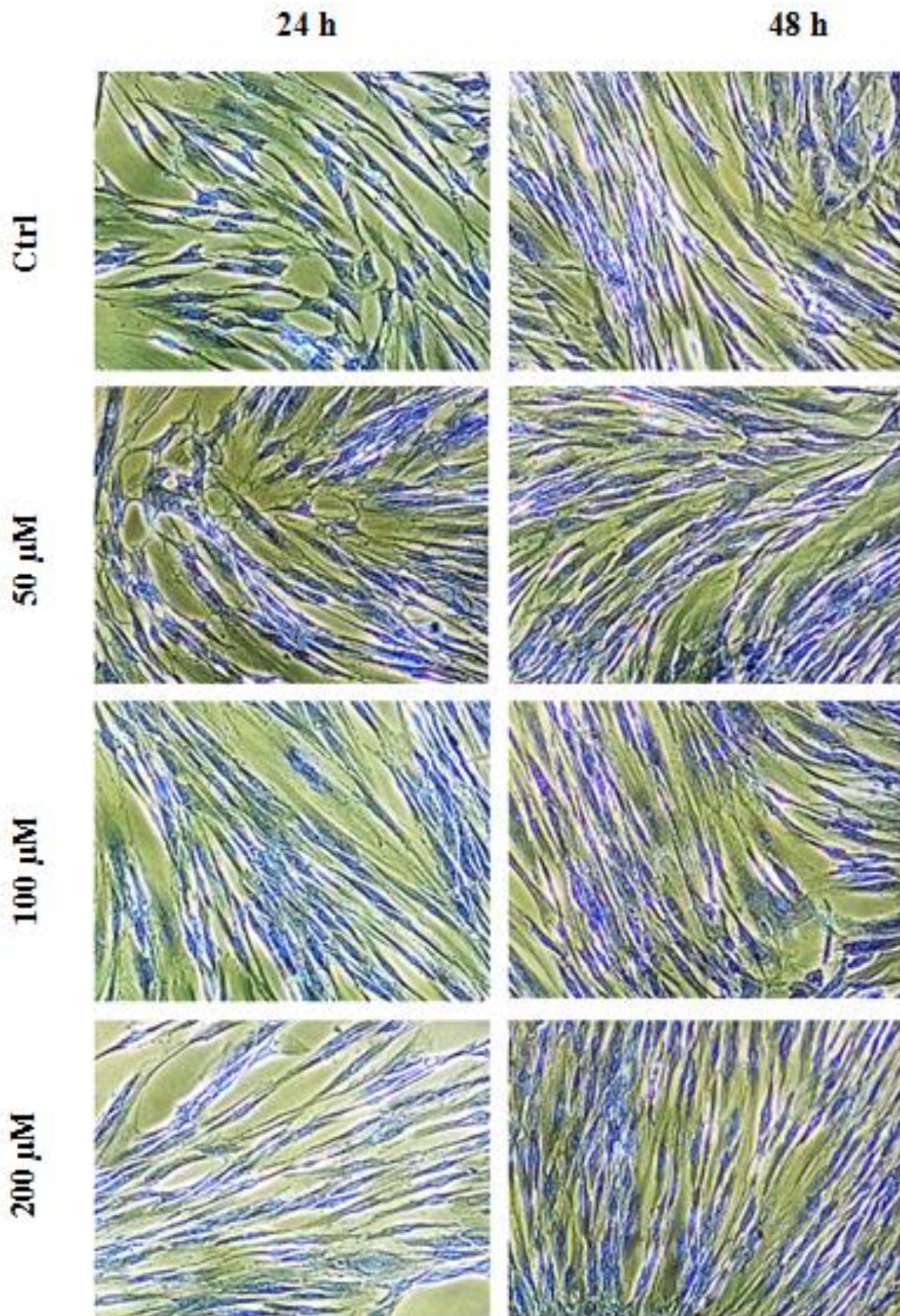


Figure 32. Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des fibroblastes gingivaux non stimulés avec le LPS. Photos des cellules colorées avec le cristal violet sous microscope inversé. Les barres d'échelle, 50 μ m.

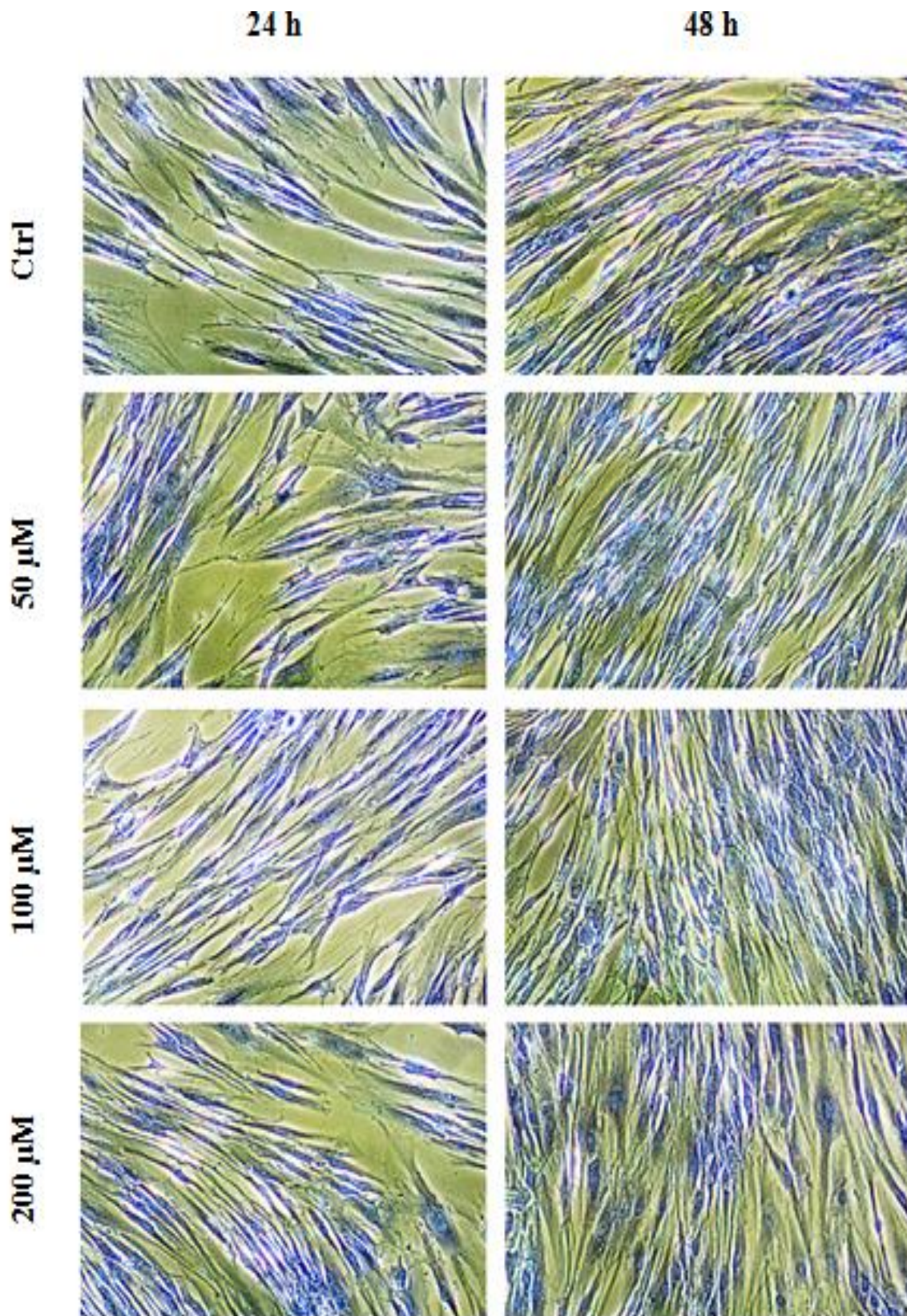


Figure 33. Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS. Photos des cellules colorées avec le cristal violet sous microscope inversé. Les barres d'échelle, 50 µm.

3.5.2. 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)

Après une période d'incubation de 24 heures, les analyses quantitatives suite à l'utilisation du test MTT indiquent qu'aucun effet significatif de l'alpha-tocophérol sur la croissance des cellules fibroblastique n'a été remarqué (Figure 34), par contre, pour une période de culture plus longue (48 heures), la croissance cellulaire est significativement ($P < 0,01$) favorisée par l'alpha-tocophérol (Figure. 34). Plus la concentration en alpha-tocophérol est élevée plus la croissance cellulaire est importante.

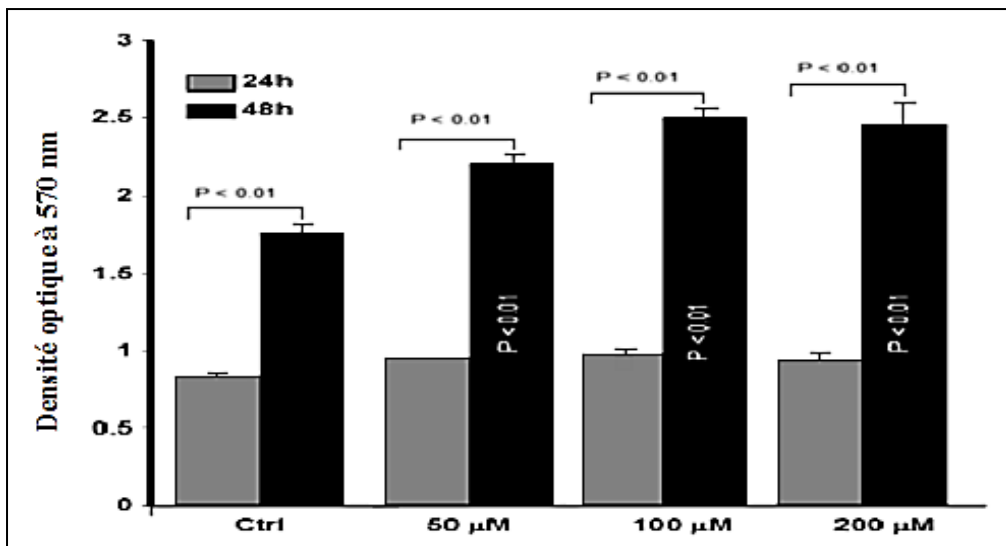


Figure 34. Effet de l'alpha-tocophérol sur la viabilité des fibroblastes gingivaux non stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 µM de l'alpha-tocophérol).

Ces résultats semblent être en accord avec les travaux antérieurs, indiquant que l'alpha-tocophérol améliore la prolifération des cellules endothéliales mises en culture (Kuzuya *et al.*, 1991). Cependant, avec d'autres types cellulaires tels que l'aorte de muscle lisse humain, les fibroblastes de souris et les cellules cancéreuses, l'alpha-tocophérol a induit une inhibition de la croissance (Boscoboinik *et al.*, 1991; Ozer *et al.*, 1993).

Les différents effets de l'alpha-tocophérol sur la prolifération cellulaire peuvent éventuellement être dûs au type de cellule. Des études standardisées sur différents types de cellules seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

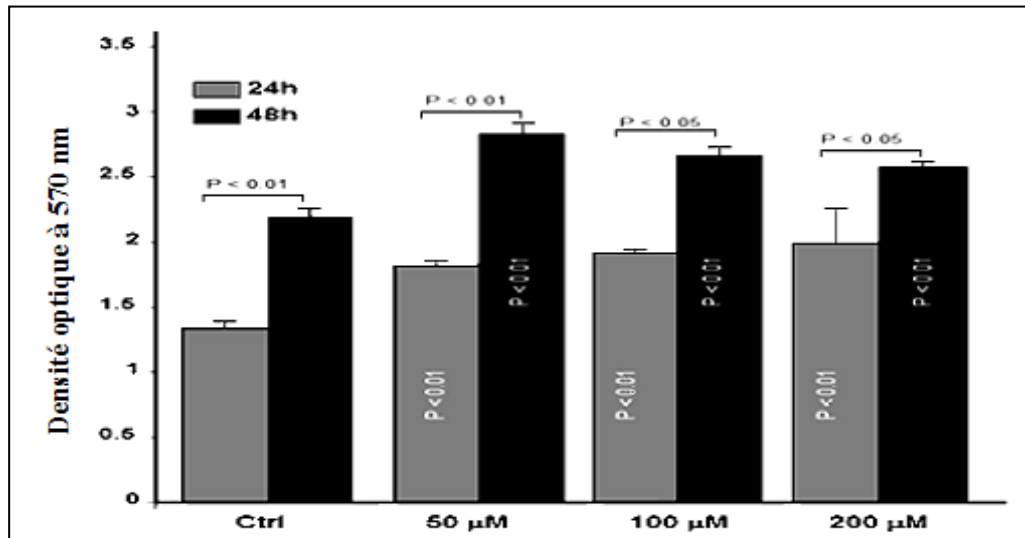


Figure 35. Effet de l'alpha-tocophérol sur la viabilité des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 µM de l'alpha-tocophérol).

Au bout de 24 heures d'incubation, l'augmentation de la croissance des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS de *P. gingivalis* et non traités avec l'alpha-tocophérol est observée. Pour une période d'incubation plus allongée (48 heures) la croissance est significativement plus élevée (figure 35).

En présence de l'alpha-tocophérol la croissance des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS de *P. gingivalis* s'est avérée significativement supérieure ($P < 0,01$). Aucune différence n'a été observée avec des concentrations plus élevées d'alpha-tocophérol. La croissance cellulaire observée après 48 heures demeure plus importante que celle de 24 heures.

Les cellules orales sont exposées à de multiples bactéries ainsi qu'à leurs produits de virulence, tels que les LPS, qui conduisent à une altération des propriétés et des fonctions cellulaires. D'après Yamaji *et al.*, (1995), les LPS de *P. gingivalis* ont induit une augmentation de la croissance des cellules fibroblastiques du ligament parodontale humain (Yamaji *et al.*, 1995).

Cela semble conforter les résultats obtenus au cours de cette présente étude, qui montrent une augmentation de la croissance des fibroblastes gingivaux suite à une stimulation avec les LPS de *P. gingivalis*. Cette surcroissance peut s'expliquer par le comportement cellulaire en réponse à une stimulation avec des endotoxines (Hattar *et al.*, 2013) ou, éventuellement, un

comportement cellulaire spécifique contre les effets nocifs de *P. gingivalis* et ces facteurs de virulence, ainsi une prévention contre les maladies parodontales (Tang *et al.*, 2013).

Le fait que la croissance cellulaire semble être favorisée par l'alpha-tocophérol, ceci suggère un rôle préventif assuré par cette molécule contre la maladie parodontale.

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

3.5.3.1. Mesure des cytokines (Interleukine-1 β et -6)

Les infections sont des promoteurs de la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires par les cellules infectées (Collins *et al.*, 2014).

Dans la cavité buccale, les fibroblastes gingivaux sont le constituant principal du parodonte et sont les acteurs clés contre l'infection en produisant divers cytokines pro-inflammatoires en réponse à un contact direct avec des bactéries parodontopathogènes ou leur facteurs de virulence, tels que les LPS (Andrukhov *et al.*, 2014). L'évolution de la sécrétion d'interleukine-1 β et -6 par les fibroblastes gingivaux en contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis* est illustrée par les figures 36 et 37.

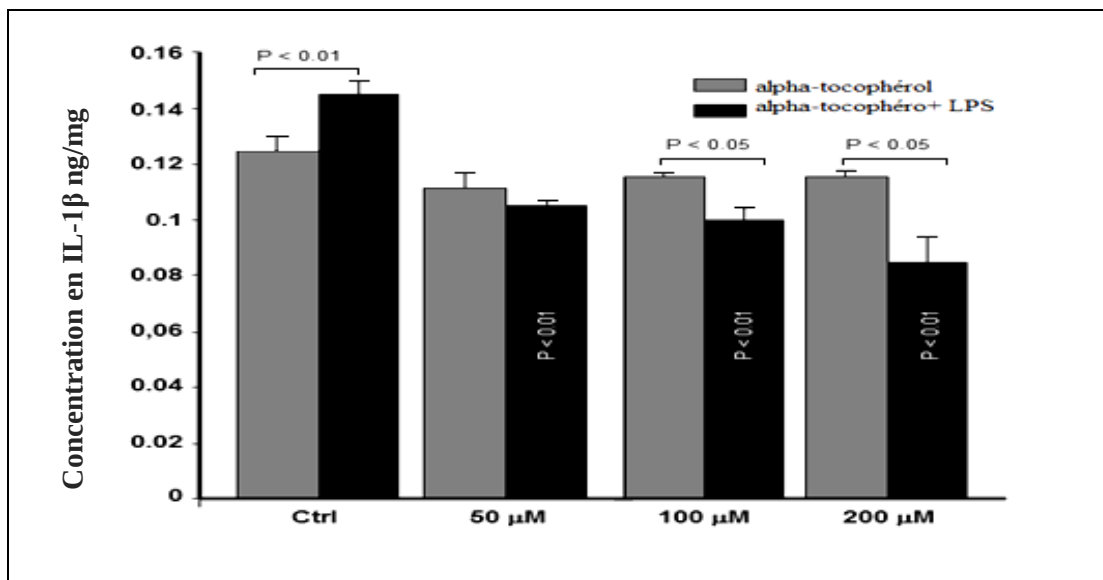


Figure 36. Sécrétion d'interleukine-1 β par les fibroblastes gingivaux après un contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 μM de l'alpha-tocophérol) en présence ou en absence de LPS.

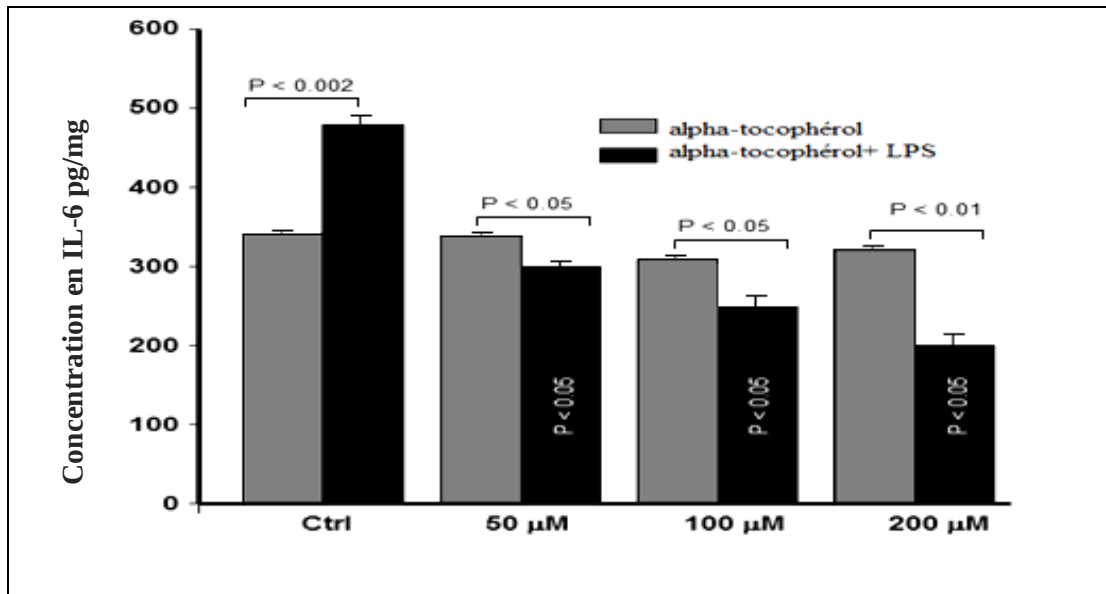


Figure 37. Sécrétion d'interleukine-6 par les fibroblastes gingivaux après contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 μM de l'alpha-tocophérol) en présence ou en absence de LPS.

Après une stimulation des fibroblastes gingivaux avec l'alpha-tocophérol pendant 48 h, la sécrétion d'IL-1β est restée inchangée par rapport à celle observée dans le témoin (figure 36). Cependant, l'addition de LPS de *P. gingivalis* à la culture a conduit à une augmentation significative ($p < 0,02$) de la sécrétion d'IL-1β.

L'alpha-tocophérol semble être capable de réguler négativement l'effet de LPS sur la sécrétion d'IL-1β. Ce résultat est révélé par les faibles niveaux d'IL-1β sécrétées par les cellules cultivées en présence de l'alpha-tocophérol et le LPS, par rapport à celles stimulées avec le LPS seul.

Quant à la sécrétion de l'IL-6, des observations similaires ont été notées. Aucun effet visible de l'alpha-tocophérol sur la sécrétion d'IL-6 par les fibroblastes gingivaux n'a été constaté. (figure 37). Cependant, les cellules stimulées avec le LPS ont montré une augmentation des niveaux de sécrétion d'IL-6. D'une manière significative ($P < 0,05$) cette sécrétion a été négativement régulée par l'alpha-tocophérol.

L'augmentation de la sécrétion des l'IL-1β et IL-6 par les fibroblastes gingivaux suite à leur stimulation avec le LPS de *P. gingivalis* a ainsi été démontrée. Des résultats similaires ont été précédemment rapportés sur l'action des LPS d'*E. coli* et de *P. gingivalis* (Herath *et al.*, 2011; Andrukhov *et al.*, 2014).

La libération des cytokines pro-inflammatoire peut être considérée comme un processus de protection des fibroblastes gingivaux en réponse à l'infection (Bamias *et al.*, 2012). Cependant, de multiples études ont indiqué que l'augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires peut contribuer à la progression de la maladie parodontale (Reis *et al.*, 2014; Baek *et al.*, 2015). La modulation négative de la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires peut ainsi être bénéfique pour la cellule hôte. Ce processus peut se produire avec la contribution de l'alpha-tocophérol. Ainsi il a été, clairement démontré que l'alpha-tocophérol diminue de manière significative la sécrétion de l'IL-1B et IL-6 par les fibroblastes gingivaux primaires stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*.

Le rôle de l'alpha-tocophérol contre les effets délétères des LPS a été l'objet des études *in vitro* et *in vivo* montrant que cette vitamine supprime la réponse inflammatoire et les dommages oxydatifs induits par les LPS sur des systèmes de culture cellulaire ou sur des modèles animaux (Suntres et Shek, 1996; Qureshi *et al.*, 2010). Il a été également montré que l'alpha-tocophérol peut efficacement prévenir la dégénérescence des neurones dopaminergiques induite par l'interféron- γ en réponse aux LPS (Shibata *et al.*, 2006) et réguler négativement la sécrétion d'IL-6 et peroxydation lipidique dans les cellules microgliales murines induite par les LPS (Godbout *et al.*, 2004). En outre, l'alpha-tocophérol a permis de favoriser le rétablissement chez les souris âgées présentant des infections induites par le LPS (Berg *et al.*, 2005). Ces découvertes et nos résultats soulignent le potentiel d'alpha-tocophérol dans la prévention des infections microbiennes.

3.5.3.2. Mesure des peptides antimicrobiens (β -défensines humaines HBD-1 et HBD-2)

Prévenir ou guérir les infections microbiennes peut être atteint par l'utilisation des molécules chimiques antimicrobiennes, telles que des antibiotiques, mais aussi à travers la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules hôtes (Strempele *et al.*, 2014). La famille des peptides antimicrobiens comprend plusieurs molécules telles que les HBDs.

Au cours de cette étude nous avons recherché les profils de sécrétion de deux β -défensines induites lors de la culture des fibroblastes gingivaux en présence de l'alpha-tocophérol avec ou sans stimulation avec le LPS de *P. gingivalis* (figures 38 et 39).

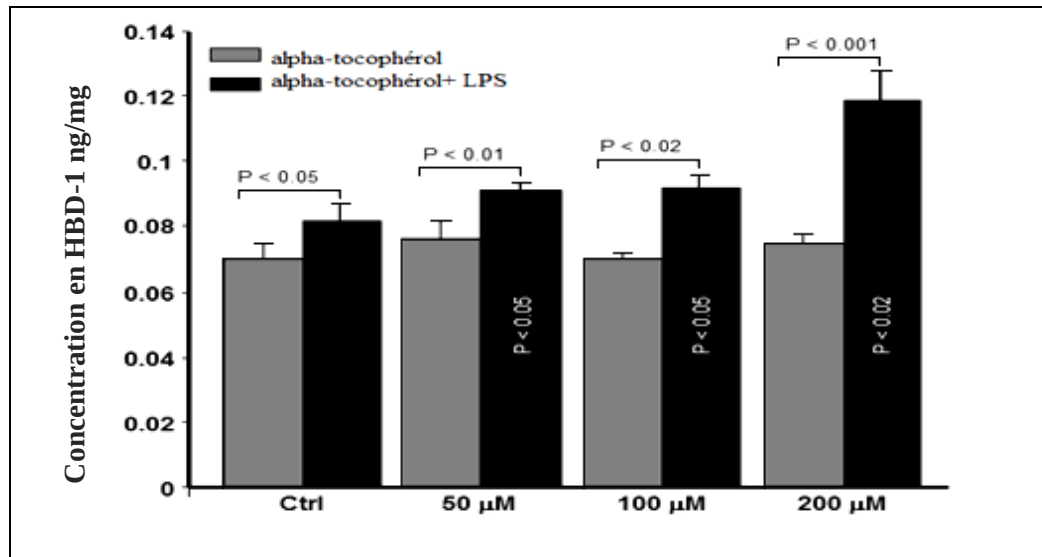


Figure 38. Sécrétion de HBD-1 par les fibroblastes gingivaux après contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 μM de l'alpha-tocophérol) en présence ou en absence de LPS.

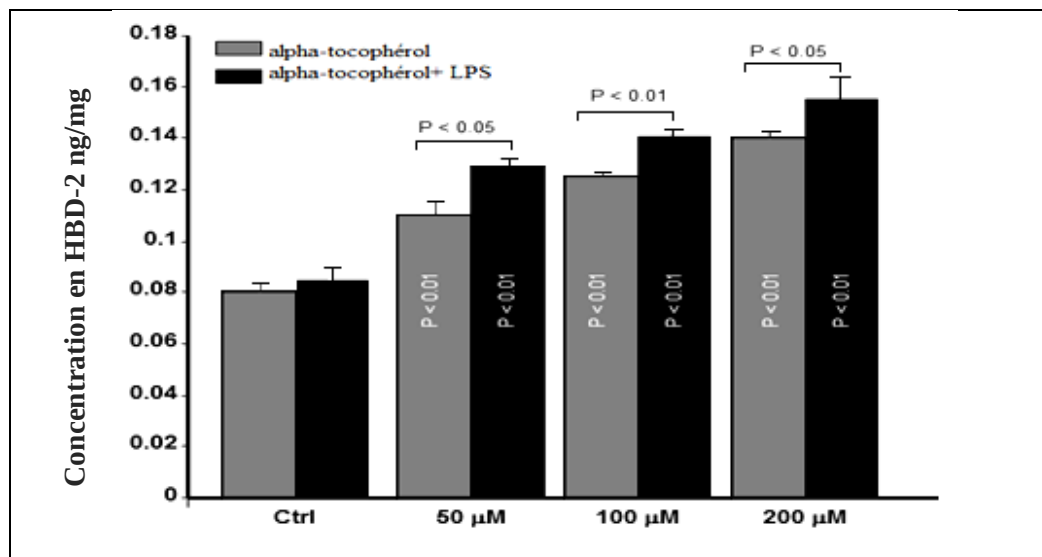


Figure 39. Sécrétion de HBD-2 par les fibroblastes gingivaux après contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS du *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 μM de l'alpha-tocophérol) en présence ou en absence de LPS.

Les résultats illustrés par la figure 38, montrent que l'alpha-tocophérol n'influçait aucunement les taux de HBD-1 sécrétées par les fibroblastes gingivaux primaires. Les niveaux de sécrétion sont très similaires en présence des différentes concentrations de cette

molécule. En revanche, Les résultats des dosages révèlent une notable augmentation des taux de HBD-1 sécrétées après la stimulation des cellules fibroblastiques avec le LPS de *P. gingivalis*.

Des niveaux plus élevés de HBD-1 ont été observés lorsque les cellules ont été stimulées avec Le LPS en présence de l'alpha-tocophérol. Une augmentation significative ($p < 0,05$) de HBD-1 sécrétées a été constatée après une exposition des fibroblastes au LPS et l'alpha-tocophérol, comparativement à ceux cultivés qu'en présence du LPS.

Quant à la sécrétion de HBD-2 par les cultures fibroblastiques primaires, cette dernière est modulée par l'alpha-tocophérol (figure 39). Une augmentation importante ($P < 0,01$) de la sécrétion de HBD-2 est observée comparativement à celle mesurée dans les cultures non traitées par l'alpha-tocophérol. Les taux de sécrétion de HBD-2 augmentent de manière significative avec l'augmentation de la concentration en alpha-tocophérol utilisée.

La stimulation des fibroblastes avec le LPS seul a conduit à des niveaux de sécrétion de HBD-2 plus élevés, ces taux sont encore plus importants en présence de l'alpha-tocophérol. Les résultats de dosage montrent que l'effet de LPS sur la sécrétion des HBD-2 est positivement régulée par l'alpha-tocophérol.

Ainsi, il a été démontré pour la première fois, la sécrétion des HBD-1 et HBD-2 par les fibroblastes gingivaux primaires humains. En plus, la stimulation de ces derniers avec l'alpha-tocophérol n'induit pas l'augmentation de la sécrétion des peptides antimicrobiens.

Cependant, le LPS de *P. gingivalis* seul ou en combinaison avec l'alpha-tocophérol conduit à une augmentation des HBD-1 et HBD-2 sécrétées par ces fibroblastes. Il a été démontré que les HBD-1 ont comme cible une variété de bactéries, y compris *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* et *Fusobacterium nucleatum* (Gorr et Abdolhosseini, 2011), tandis que les HBD-2 sont actif contre les bactéries à Gram négatifs et *Candida albicans* mais avec une activité restreinte contre les bactéries à Gram positifs (Dale et Fredericks, 2005, Cáceres *et al.*, 2014). Cela peut expliquer les niveaux élevés des HBD-1 et HBD-2 sécrétées en réponse à la stimulation avec le LPS de *P. gingivalis* et leurs taux qui son positivement régulés suite à l'ajout d'alpha-tocophérol aux cultures des fibroblastes. Cette présente étude suggère que l'alpha-tocophérol induit l'activation des mécanismes de défense des cellules fibroblastiques contre le LPS en produisant HBD-1 et HBD-2. Les données globales, suggèrent ainsi que l'alpha-tocophérol peut moduler les réactions inflammatoires et la

destruction tissulaire en réduisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et en augmentant les taux des peptides antimicrobiens HBD-1 et HBD-2. D'autres études seront nécessaires pour élucider les mécanismes de signalisation impliqués avec l'alpha-tocophérol. Une fois l'inflammation contrôlée, la guérison des blessures au niveau des tissus parodontaux peut être atteinte.

3.5.4. Cicatrisation des fibroblastes gingivaux primaires en contact avec le LPS de *P. gingivalis* sous l'effet de l'alpha-tocophérol

L'alpha-tocophérol a modulé la migration des cellules fibroblastiques (Figure 40 et 41). Ce constat est révélé par la réduction de la surface de la plaie au niveau des monocouches primaire traitées avec l'alpha-tocophérol en comparaison à celles non-traitées.

L'effet de l'alpha-tocophérol s'est avéré remarquable avec un début perceptible de la migration cellulaire après 12 heures de l'induction de la plaie (Figure 40). L'effet était significatif à des concentrations de 100 et 200 μ M d'alpha-tocophérol (Figure 41a).

Aucune inhibition ou excitation de la migration cellulaire n'a été observé lors de la stimulation des cultures avec le LPS seul. Cependant, des taux de migration cellulaire et de cicatrisation supérieure ont été remarqués au niveau des cultures stimulées avec le LPS et traitées avec l'alpha-tocophérol. (Figure 41a).

Des résultats comparables ont été obtenus après 24 h de l'induction de la plaie. A partir d'une concentration de 50 μ M d'alpha-tocophérol la migration des cellules et la réparation de la plaie est significativement favorisée (Figure 41b).

Une migration plus importante a été notée lors de la stimulation des cellules avec le LPS seul par rapport à ce qui a été observé en absence de LPS. Cette augmentation est positivement régulée par l'alpha-tocophérol. Ainsi, plus la concentration en alpha-tocophérol est élevée, plus la réparation de la plaie est importante (Figure 41b).

Après 48 heures, la migration cellulaire est positivement modulée à partir de 50 μ M d'alpha-tocophérol. Les taux de cicatrisation sont plus marqués et la quasi-totalité de la zone de la plaie est réparée (Figure 41c).

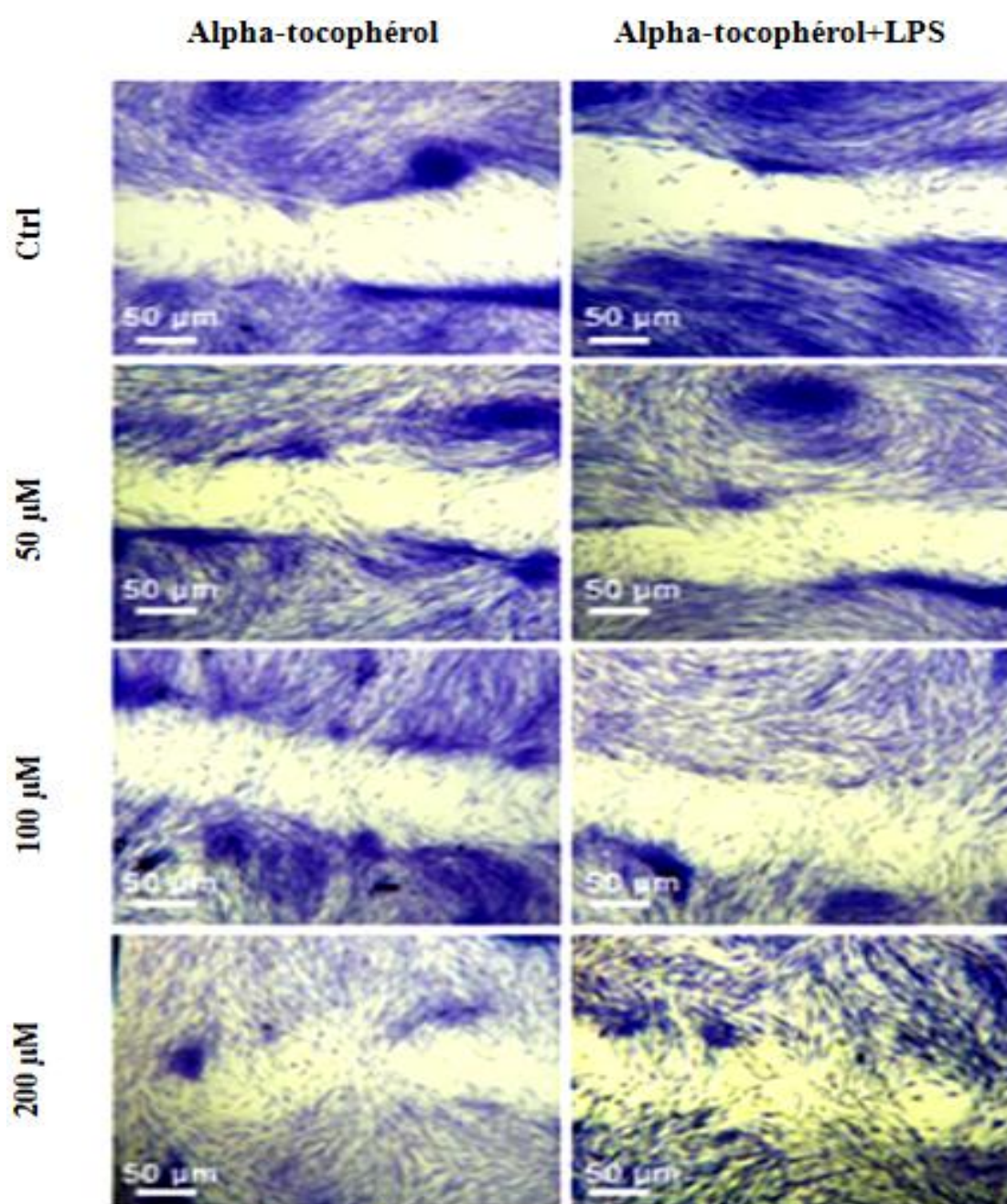


Figure 40. Cicatrisation des fibroblastes sous l'effet de l'alpha-tocophérol après 12 heures de l'induction de la plaie. Les barres d'échelle, 50 µm.

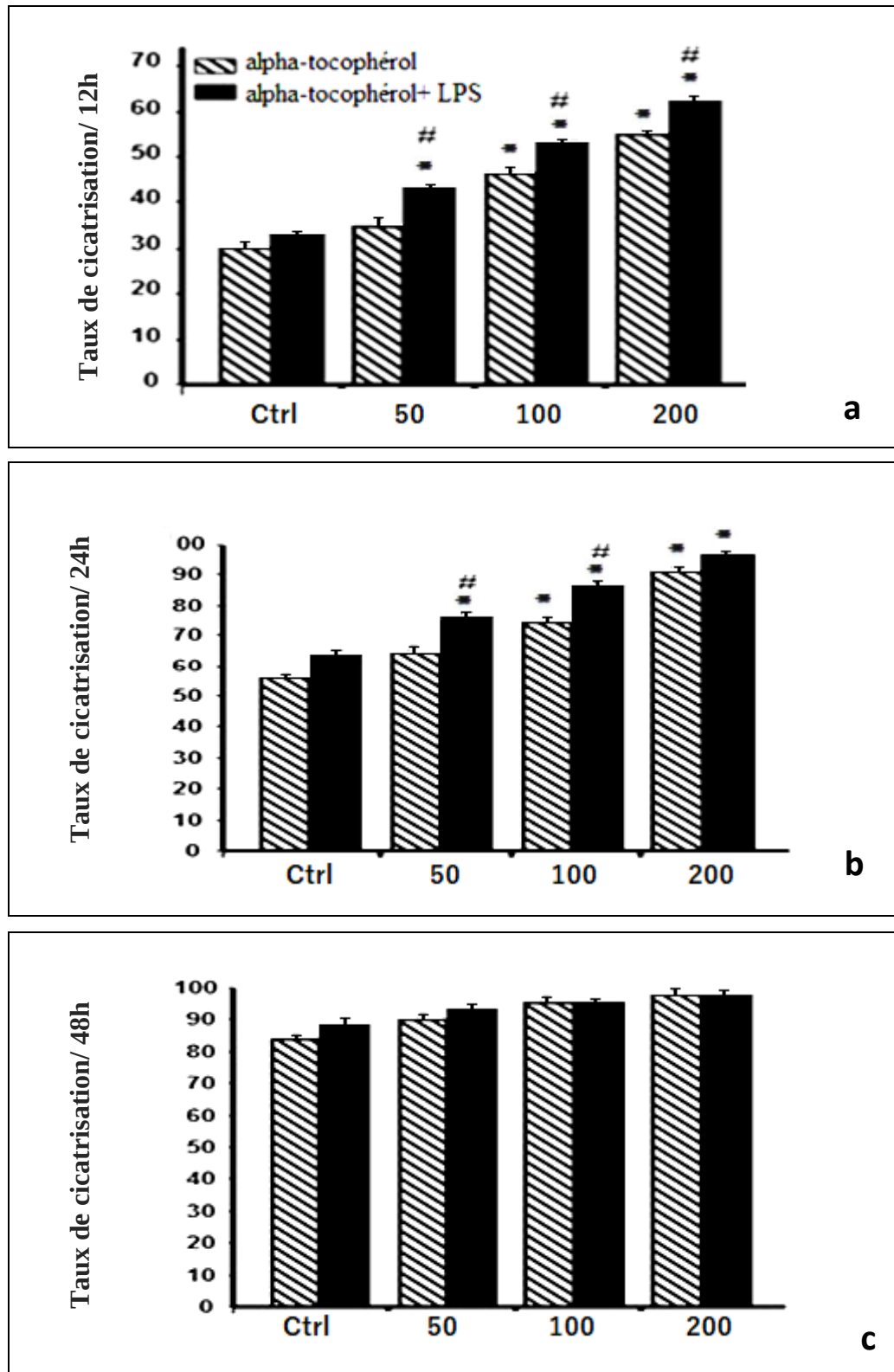


Figure 41. Taux de la cicatrisation des fibroblastes sous l'effet d'alpha-tocophérol.

*: $p < 0,05$ versus contrôle (0 μM de l'alpha-tocophérol). #: $p < 0,05$ versus sans LPS.

L'une des principales cellules impliquées dans la guérison de la plaie parodontale est le fibroblaste gingival (Bainbridge, 2013; Cáceres *et al.*, 2014). Les fibroblastes ont un phénotype prolifératif et une grande capacité de synthétiser et déposer les composants de la matrice extracellulaire nécessaires à la guérison adéquate de la plaie (Bainbridge, 2013; Cáceres *et al.*, 2014). Des modèles de cicatrisation des plaies sont souvent utilisés *in vitro* afin d'évaluer l'effet de divers agents sur les cellules cibles (Semlali *et al.*, 2011). Ces modèles consistent en des rayures réalisées sur des monocouches de cellules afin de créer une zone de cellules libres, permettant ainsi, de comprendre la façon avec laquelle les cellules migrent et couvrent cette zone. Le scratch test effectué sur une monocouche cellulaire a été utilisé dans cette étude pour évaluer la capacité de l'alpha-tocophérol à favoriser la migration cellulaire et par conséquent, la cicatrisation des plaies. Les cellules traitées avec l'alpha-tocophérol ont occupé d'une manière significative la plus grande partie de la zone de la plaie, à partir de 12 h jusqu'à 48 h, avec ou sans LPS. Les résultats indiquent que la vitamine a pu favoriser la guérison de la parodontite à un stade précoce en stimulant à la fois la croissance des fibroblastes gingivaux et leur migration, avec un effet marqué lorsque l'alpha-tocophérol est combinée avec le LPS. Ce qui permet de surmonter l'impact négatif du LPS de *P. gingivalis*, qui non seulement favorise l'inflammation mais aussi l'apparition de la maladie parodontale. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes indiquant l'amélioration de la cicatrisation des plaies gingivales suite à l'utilisation *in vitro* (Nizam *et al.*, 2014) et *in vivo* de la vitamine E (Kim et Shklar, 1983). Laheij *et al.*, (2013) ont récemment montré que le contact direct avec *P. gingivalis* ou son surnageant brut de culture inhibe la migration des cellules épithéliales. Il est à noter que lors du contact direct avec la cellule hôte, différents facteurs de virulence peuvent être sécrétés. Cependant dans cette étude, nous n'avons ciblé que le LPS de *P. gingivalis*. De ce fait la détermination de l'effet de *P. gingivalis* et ces facteurs des virulences combinés à la cicatrisation des blessures gingivales doit faire l'objet de travaux supplémentaires.