



HAL
open science

Caractérisation de tissus épithélio-conjonctifs : analyse des marqueurs moléculaires et organisationnels en conditions physiopathologiques

Camille Ober

► **To cite this version:**

Camille Ober. Caractérisation de tissus épithélio-conjonctifs : analyse des marqueurs moléculaires et organisationnels en conditions physiopathologiques. Chimie organique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30056 . tel-03716147

HAL Id: tel-03716147

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03716147>

Submitted on 7 Jul 2022

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Camille OBER

Le 12 mai 2022

**Caractérisation de tissus épithélio-conjonctifs : analyse des
marqueurs moléculaires et organisationnels en conditions
physiopathologiques**

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Sciences et Génie des Matériaux**

Unité de recherche :

**CIRIMAT - Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des
Matériaux**

Thèse dirigée par

Valérie SAMOUEILLAN et Marie-Hélène LACOSTE-FERRE

Jury

M. Manuel DAUCHEZ, Rapporteur

M. Eric BOULANGER, Rapporteur

Mme Brigida BOCHICCHIO, Examinatrice

Mme Valérie SAMOUEILLAN, Directrice de thèse

Mme Nadia CHOUINI-LALANNE, Présidente

« La seule limite à notre épanouissement de demain sera nos doutes d'aujourd'hui. »
De Franklin Delano Roosevelt

Remerciements

Cette thèse s'est déroulée au sein de l'équipe Physique des Polymères du CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux) en partenariat avec le Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse.

J'aimerais remercier chaleureusement le Pr. Nadia CHOUINI-LALANNE, pour avoir présidé mon jury de soutenance de thèse, le Pr Manuel DAUCHEZ et le Pr Eric BOULANGER pour avoir pris le temps de rapporter mon manuscrit, et Pr. Brigida BOCHICCHIO pour avoir examiné avec attention ce travail. Grâce à l'ensemble des membres de jury, cette soutenance de thèse restera pour moi un moment de discussion scientifique mémorable.

Merci à ma directrice de thèse, Valérie SAMOUILLAN ainsi qu'à ma co-directrice de thèse, Marie-Hélène LACOSTE-FERRE, pour leur patience et leur bienveillance durant ces années. Leurs conseils et leurs critiques scientifiques m'ont poussé à persévérer dans cette démarche « transdisciplinaire ».

Je remercie également très vivement Laure GIBOT et Sophie GIROD-FULLUNA, pour avoir proposé des collaborations universitaires me permettant ainsi de mettre en place un protocole de caractérisation robuste et fiable.

J'ai eu la chance de réaliser des modules d'enseignement au sein de l'IUT Mesures Physiques et je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe pédagogique pour m'avoir accompagné dans la mise en place des différents TP.

Mes remerciements les plus sincères à Colette LACABANNE, pour me permettre d'effectuer ce travail de recherche au sein du laboratoire.

Je tiens particulièrement à remercier Jany DANDURAND, pour m'avoir formé à l'ACD et pour son aide précieuse tout au long de cette thèse. Je remercie également les autres permanents du laboratoire, pour avoir apporté leur expertise à l'utilisation des différents outils de caractérisations.

Je n'oublierai jamais les pauses-café et autres bons moments partagés avec mes collègues doctorants du Phypol, je pense notamment à Guilhem, Baptiste, Tutea et Victor (co-bureau). Mes amitiés à l'ensemble des doctorants et post-doctorants de l'équipe.

Je remercie chaleureusement ma sœur, mon papa et Alexandre d'avoir assisté à cette journée de soutenance.

Enfin, je dédie ce mémoire à celle qui me pousse à aller toujours plus loin dans la vie : ma maman.

Glossaire.....	xi
Introduction	1
I. Etude bibliographique	5
I.A Les muqueuses.....	5
I.B La cavité buccale	5
I.C La muqueuse buccale.....	6
I.C.1. Anatomie topographique	6
I.C.2. Histologie	7
I.D Le milieu environnant : la salive	20
I.D.1. Composition de la salive	21
I.D.2. Rôle de la salive	23
I.E Vieillissement cutanéomuqueux	24
I.E.1. Vieillissement intrinsèque	24
I.E.2. Vieillissement extrinsèque	31
I.F Caractérisation physico-chimique	31
I.F.1. Analyses vibrationnelles	32
I.F.2. Analyses mécaniques	34
I.F.3. Analyses thermiques	36
I.F.4. Analyses diélectriques.....	37
II. Matériaux et méthodes	39
II.A Echantillons	39
II.A.1. Echantillons prélevés dans le cadre de l'étude préliminaire.....	39
II.A.2. Echantillons prélevés dans le cadre de l'étude clinique MMOBUCC	40
II.A.3. Feuilletts dermiques.....	43
II.A.4. Explants de peau de souris.....	45
II.B Méthodes	46
II.B.1. Spectroscopie Infrarouge en réflexion totale atténuée (IRTF-ATR).....	46
II.B.2. Analyse Thermo Gravimétrique (ATG)	49
II.B.3. Analyse Calorimétrique Diatherme (ACD).....	51
II.B.4. Analyse mécanique dynamique (AMD).....	54
II.B.5. Analyses statistiques.....	59
II.C Méthodes appliquées aux matériaux.....	62
III. Mise en place et validation d'un protocole de caractérisation sur des modèles animaux	63
III.A Caractérisation physico-chimique de la muqueuse buccale porcine et définition des biomarqueurs associés.....	63

III.A.1.	Signature vibrationnelle des échantillons de muqueuse buccale.....	63
III.A.2.	Hydratation et domaine de stabilité thermique de la muqueuse buccale.....	75
III.A.3.	Organisation hydrique et structure physique des protéines de la muqueuse buccale	78
III.A.4.	Signature viscoélastique	86
III.B	Caractérisation physico-chimique de la peau de souris et comparaison des marqueurs associés en condition physiopathologique	93
III.B.1.	Signature vibrationnelle des explants de peaux de souris	93
III.B.2.	Signature thermique des explants de peaux de souris	96
III.B.3.	Signature viscoélastique des explants de peaux de souris	99
III.C	Récapitulatif.....	101
IV.	Etude clinique.....	103
IV.A	Description de la population.....	105
IV.A.1.	Données cliniques locales et générales.....	105
IV.A.2.	Lien entre les données sociodémographiques, cliniques générales et locales	106
IV.B	Marqueurs thermiques	110
IV.B.1.	Lien entre les marqueurs thermiques et la classe d'âge des patients.....	110
IV.B.2.	Lien entre les marqueurs thermiques et le score OHAT	113
IV.B.3.	Lien entre les marqueurs thermiques et les signes cliniques locaux inflammatoires.....	113
IV.B.4.	Lien entre les marqueurs thermiques et les pathologies	113
IV.B.5.	Lien entre les marqueurs thermiques et les traitements médicamenteux	114
IV.C	Marqueurs vibrationnels	116
IV.C.1.	<i>Lamina propria</i>	116
IV.C.2.	<i>Epithélium</i>	125
IV.C.3.	Le biofluide.....	132
IV.D	Marqueurs mécaniques	144
IV.E	Corrélation entre les marqueurs biophysiques et les données cliniques/âge	146
IV.E.1.	Réponse à l'objectif principal : évolution des marqueurs liés à l'âge	146
IV.E.2.	Réponse aux objectifs secondaires	147
V.	Caractérisation de feuillets dermiques issus de l'ingénierie tissulaires	153
V.A	Caractérisation et validation du modèle de feuillet dermique	153
V.A.1.	Composition moléculaire des feuillets dermiques par spectroscopie IRTF en mode ATR.....	153
V.A.2.	Analyses de la réponse thermique des feuillets dermiques	165

V.B Influence des traitements physiques sur les propriétés physico-chimiques des feuillets dermiques	168
V.B.1. Evaluation des traitements d'électroporation sur la réponse spectrale Infrarouge des feuillets dermiques humains	168
V.B.2. Effet de l'inhibiteur des métalloprotéases (MMP) sur la matrice de collagène	180
V.C Résumé	182
Conclusion générale et perspectives.....	185
Références bibliographiques	187
Annexes	203

Glossaire

ACD: Analyse Calorimétrique Diatherme

ACP: Analyse en Composantes Principales

AGE: Advanced Glycation End-Product

AMD: Analyse Mécanique Dynamique

ATG: Analyse Thermogravimétrique

ATR: Attenuated Total Reflectance

CTRL : Contrôle

CS: Sulfate de chondroïtine

Cys: Cystéine

db/db: Diabétique

DS: Sulfate de dermatane

DTG: Dérivée de la perte de masse

EBP: Elastin Binding Protein

FSD: Auto-Déconvolution de Fourier

FRI : Facteur de Risque Inflammatoire

GAG: Glycoaminoglycane

HA: Acide hyaluronique

HS: Sulfate d'Héparine

Hyp: Hydroxyproline

IRTF: Infra-Rouge à Transformée de Fourier

KS: Sulfate de Kératane

LP: Electrotransfert de gènes

LOX: Lysyl Oxydase

MEB: Microscopie Electronique à Balayage

MEC: Matrice Extracellulaire

MMOBUC: Modifications Moléculaires et Organisationnelles de la muqueuse BUCcale

MMP: Métalloprotéases

OHAT: Oral Health Assessment Tool

OHI: Oral Health Index

PG: Protéoglycane

Pro: Proline

PRP: Protéines Riches en Proline

ROS: Reactive Oxygen Species

SBI: Sulcus Bleeding Index

SFA: Substance Fondamentale Amorphe

SP: Electrochimiothérapie

TEM : Microscopie électronique à Transmission

TG: Courbe de perte de masse

UVs: Rayons Ultraviolets

WT: Wild Type

Introduction

L'expérience du vieillissement est à la portée de chaque être humain et est souvent confondue avec le passage du temps. Mais le vieillissement ne peut uniquement se définir par rapport à l'âge et au nombre d'années de vie. Ainsi, il est aujourd'hui admis que le vieillissement est une résultante multifactorielle. Les maladies chroniques, le mode de vie, l'alimentation, la génétique interviennent dans ce processus.

Chaque organe peut être touché par le vieillissement ; en particulier le système tégumentaire (peau, muqueuses, phanères). Il existe des signes évidents comme les rides, les cheveux blancs qui sont autant de témoins visibles. Les téguments constituent une interface entre le corps et l'environnement et donc des facteurs internes et externes (UVs, pollution, chocs) vont directement influencer sur son évolution dans le temps. La peau (ou tégument externe) est l'enveloppe externe de tout le corps, les muqueuses (ou téguments internes) tapissent les cavités du corps qui sont en continuité avec la peau. D'un point de vue histologique, toutes deux sont des tissus épithélio-conjonctifs.

L'équipe Phypol du CIRIMAT travaille depuis de nombreuses années sur la thématique du vieillissement. Les approches et techniques interdisciplinaires issues de la physique et de la science des matériaux ont permis une meilleure connaissance de l'organisation et de la dynamique moléculaire des tissus biologiques tels que la peau et les tissus cardiovasculaires [1], [2].

Le travail de thèse est axé sur la caractérisation de tissus épithélio-conjonctifs et propose une analyse des marqueurs moléculaires et organisationnels en conditions physiopathologiques (vieillesse, pathologies locales et générales).

Alliant recherche fondamentale et recherche clinique, ce travail de thèse a été réalisé en trois étapes principales :

- **L'élaboration d'un protocole d'essais** biophysiques encadrée par l'équipe Phypol (choix & validation des essais, optimisation de la taille des échantillons et leur traitement).
- **L'établissement d'un protocole de recherche clinique** encadré par le CHU de Toulouse (accès aux données cliniques, réalisation de prélèvements humains et exploitation des données).
- **Le transfert des protocoles** de caractérisation biophysique pour des tissus cutanés via des collaborations :
 - avec l'équipe IDeAS du laboratoire des IMRCP (Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique) (ingénierie tissulaire),
 - avec l'équipe PPB (Phosphates, Pharmacotechnie, Biomateriaux) du CIRIMAT (stratégies thérapeutiques innovantes).

Durant la **première phase** du projet, les prélèvements sur la muqueuse buccale porcine ont permis d'optimiser le protocole de mesure via l'utilisation de **techniques biophysiques** (calorimétriques, vibrationnelles et mécaniques). En sondant au niveau structural et dynamique de biopsies de faible dimension depuis l'échelle moléculaire jusqu'à l'échelle mésoscopique, il

a été possible de définir les **biomarqueurs** associés à l'organisation hydrique, à la composition moléculaire et à la structure physique de la muqueuse buccale porcine.

Dans un **second temps**, la mise en place de l'étude clinique sur tissu humain a nécessité la rédaction d'un **protocole spécifique** s'inscrivant dans une démarche éthique et réglementaire stricte, encadrée par la loi relative aux Recherches Impliquant la Personne Humaine (Loi Jardé), entrée en application le 18 novembre 2016.

Ainsi, le protocole intitulé **MMOBUCC (Modifications Moléculaires et Organisationnelles de la muqueuse BUCCale humaine lors du vieillissement** ; code promoteur : RC31/19/0423) de catégorie **2** a été rédigé sous la responsabilité de l'investigateur principal et validé par le promoteur. Outre le schéma détaillé de la recherche (justification, objectifs, hypothèse de recherche, déroulement), sont prévus la gestion des événements indésirables, la surveillance de la recherche, l'accès aux données, le contrôle et l'assurance qualité, les considérations éthiques et la conservation des documents. Cette étude est inscrite sur le registre d'essais cliniques ClinicalTrials.gov (site <http://www.clinicaltrials.gov/>).

L'**objectif principal** de l'étude clinique a ainsi été d'extraire la distribution des **biomarqueurs** hydriques, moléculaires et structuraux de la **muqueuse buccale** pour une population de patients de deux tranches d'âge différentes dont les caractéristiques sociodémographiques et cliniques (sexe, données cliniques locales et générales) sont connues. Grâce à l'accès encadré aux données médicales, la recherche de corrélations entre données cliniques et marqueurs biophysiques de la muqueuse buccale humaine a été possible et a permis en particulier de définir des biomarqueurs spécifiques au **vieillissement physiopathologique**. La muqueuse et son biofluide associé - la salive - étant cliniquement corrélés, l'étude moléculaire de la **salive** a également été entreprise.

L'étude de faisabilité et le protocole MMOBUCC ont constitué les éléments essentiels et inconditionnels de ce travail de thèse inédit.

En parallèle de notre **axe principal de recherche sur la muqueuse buccale**, deux collaborations universitaires ont permis de transférer le protocole de caractérisation biophysique mis en place à l'étude de **tissus cutanés** pour répondre à différentes problématiques.

Une première collaboration a vu le jour avec l'équipe PPB (Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux) du CIRIMAT, qui développe des stratégies thérapeutiques innovantes pour la cicatrisation de plaies chroniques. Nous nous sommes proposés de caractériser des **explants de peaux de souris** et de vérifier l'évolution des **biomarqueurs** associés à ce type de tissu suivant une pathologie spécifique : le **diabète de type II**.

La deuxième collaboration, initiée avec l'équipe IDeAs du laboratoire des IMRCP (Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique), a permis d'une part d'appréhender l'organisation de la matrice extracellulaire d'un **tissu dermique « modèle »**. D'autre part, l'équipe IDeAs propose une approche originale ; celle d'utiliser la technique d'électroporation afin d'évaluer son potentiel à induire localement et transitoirement un **remodelage de la matrice extracellulaire** sans actif pharmacologique. Ainsi, nous avons étudié l'effet de l'**électroporation** sur les indicateurs spécifiques des feuilletts dermiques, pour contribuer au développement de thérapies alternatives aux traitements pharmacologiques.

Le mémoire se divise en 5 parties :

- Le premier chapitre porte sur la description détaillée des fonctions et des principaux composés des couches constitutives de la muqueuse buccale ainsi que la composition de son biofluide. Les théories du vieillissement et leurs conséquences sur les tissus épithélio-conjonctifs ainsi que l'apport des techniques de caractérisation physico-chimique à l'analyse de tissus cutanéomuqueux sont développés dans cette partie.
- Le deuxième chapitre présente les protocoles d'extraction et de conservation des échantillons étudiés ainsi que les techniques biophysiques (IRTF, ACD, ATG, AMD).
- Le troisième chapitre est dédié à l'élaboration et à la validation d'un protocole de routine visant à obtenir les biomarqueurs les plus pertinents et reproductibles sur la muqueuse buccale porcine. Le transfert de ce protocole à l'analyse d'explants de peaux de souris dans un état pathologique est également décrit.
- Le protocole MMOBUCC fait l'objet du quatrième chapitre. Le lien entre les marqueurs biophysiques et les données cliniques est détaillé.
- Le cinquième chapitre traite de l'analyse physico-chimique de feuillets dermiques en vue d'évaluer le potentiel de la technique d'électroporation.

I. Etude bibliographique

I.A Les muqueuses

Par définition, une muqueuse (du latin *mucus*) est une mince couche de tissu constituée d'un *épithélium* et de tissu conjonctif sous-jacent, appelé chorion ou *lamina propria* [3]. Les muqueuses tapissent les cavités du corps qui sont en continuité avec la peau. L'*épithélium* et la *lamina propria* sont séparés par une lame basale.

Les muqueuses sont présentes au niveau des parois :

- du tube digestif (de la bouche à l'anus), faisant partie de l'appareil digestif humain,
- de l'appareil respiratoire
- de l'appareil uro-génital (utérus, vagin, urètre, vessie, uretère).

La spécificité d'une muqueuse est d'être en permanence humide ou humidifiée, comme les muqueuses urinaires avec l'urine. Les muqueuses sont beaucoup plus perméables que la peau à l'eau et à de nombreuses substances.

- Les muqueuses digestives, sexuelles, respiratoires ou buccales possèdent des glandes sécrétant un *mucus* (substance liquide à visqueuse). A titre d'exemple, les sécrétions nasales empêchent les particules étrangères inhalées d'atteindre les parties profondes du poumon.
- Les muqueuses respiratoires et nasales sont aussi dotées respectivement de cils et de poils. Lorsque les micro-organismes arrivent à pénétrer l'organisme, ils se collent à la substance puis sont ingérés, détruits par des globules blancs ou rejetés par les cils et l'expectoration.
- L'ensemble de la bouche est constamment hydraté et lubrifié par la salive. A tout âge, un équilibre s'établit entre la prolifération bactérienne, le flux salivaire et la réponse tissulaire. La régulation de cet écosystème participe à la protection du complexe buccal contre les pathologies inflammatoires et infectieuses.

I.B La cavité buccale

La cavité buccale représente le premier segment du système digestif et constitue le premier site de la digestion. Avec la respiration et la phonation, la mastication, l'insalivation et la déglutition des aliments sont les principales fonctions réalisées par la cavité orale et ses annexes. L'appareil manducateur est l'ensemble fonctionnel qui comprend :

- le système dentaire,
- le système ostéo-articulaire,
- le système neuro-musculaire.

La cavité buccale possède également un rôle expressif et esthétique via les expressions du visage [4][5].

La cavité buccale est occupée par les arcades dentaires, qui divisent celles-ci en deux régions (Figure 1) :

- Le vestibule buccal : comme son nom l'indique, le vestibule est un espace en forme de fer à cheval creux délimité par les lèvres, l'orifice buccal, les joues, le bord antérieur des branches montantes mandibulaire ainsi que par le fond des sillons vestibulaires. Celui-ci est tapissé de muqueuse buccale.
- La cavité orale proprement dite : elle correspond à la zone délimitée par le palais dur et la partie antérieure mobile de la langue. Une fois la bouche fermée, les parois externes et internes du vestibule sont en contact direct avec les dents et les gencives.

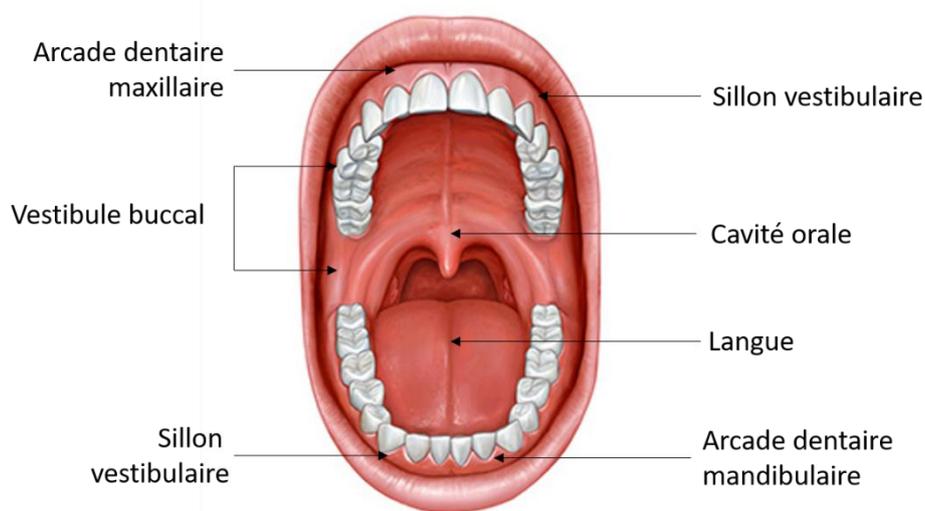


Figure 1 : La cavité buccale

I.C La muqueuse buccale

I.C.1. Anatomie topographique

La cavité buccale possède 3 types de muqueuses : la muqueuse masticatoire, la muqueuse alvéolaire et la muqueuse dite spécialisée, la muqueuse linguale [4][5].

La muqueuse alvéolaire recouvre 60% de la cavité buccale à savoir au niveau des joues, des lèvres et du palais mou. La muqueuse dite spécialisée n'est autre que la muqueuse située sur la langue, composée d'une couche épithéliale papillaire.

La muqueuse masticatoire est située au plus près des dents et recouvre les procès alvéolaires et/ou les crêtes édentées. Elle représente près de 25% de la surface totale de la cavité buccale et comprend la gencive attachée, la gencive libre ainsi que le palais dur. Ces muqueuses sont directement impactées par les effets de la mastication et par l'entrée de micro-organismes. La muqueuse alvéolaire est séparée de la muqueuse masticatoire par la ligne muco-gingivale.

Lorsque les dents sont présentes, la muqueuse masticatoire est décrite en 2 zones distinctes : la gencive libre et de la gencive dite attachée. Chez le sujet édenté, le procès alvéolaire est recouvert de muqueuse masticatoire (Figure 2).

La gencive libre sertit les dents sans être attachée à leur surface. La gencive attachée adhère à l'os alvéolaire. En l'absence des dents, la gencive libre n'existe plus et seule persiste la gencive attachée qui est adhérente à la crête osseuse sous-jacente.

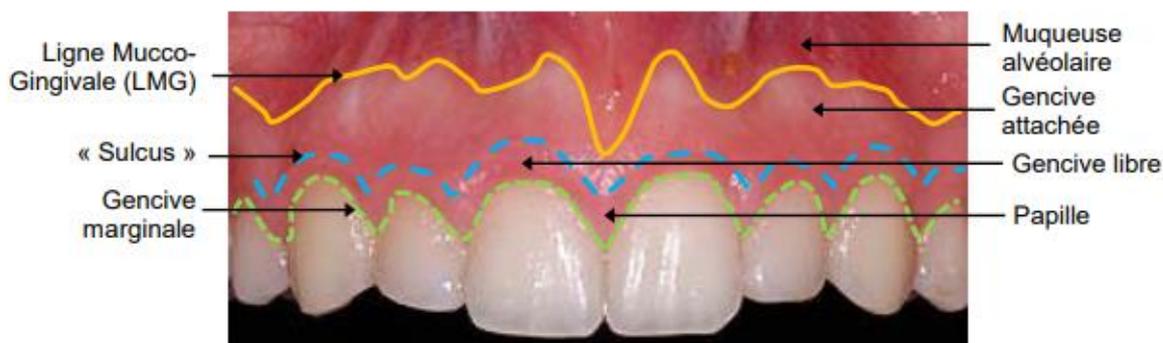


Figure 2 : Structure de la muqueuse buccale [6]

I.C.2. Histologie

La muqueuse buccale est composée d'un *épithélium* reposant sur un tissu conjonctif (*lamina propria* ou *chorion*) par l'intermédiaire d'une lame basale (Figure 3).

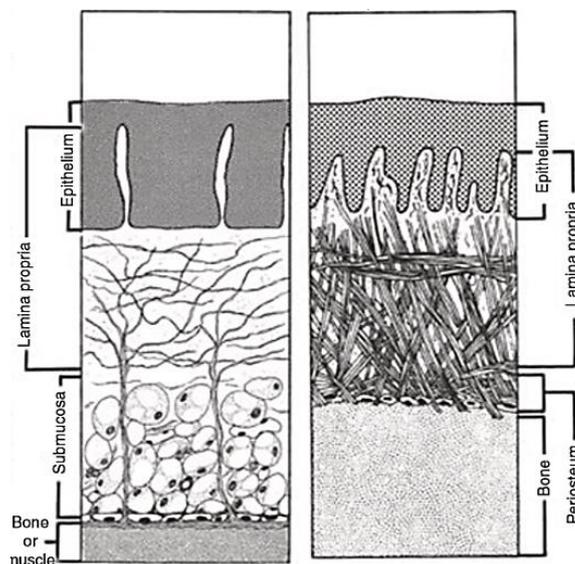


Figure 3 : Coupe schématique de la muqueuse buccale alvéolaire (à gauche) et de la muqueuse masticatoire (à droite) [3]

I.C.2.1 L'épithélium

L'*épithélium* buccal représente la première protection barrière à l'environnement buccal. Son épaisseur, estimée à environ 0,3 mm par les techniques de tomographie optique [7], est très variable d'un individu à l'autre, et fortement influencée par les effets des traitements

médicamenteux, le stress et l'inflammation locale [8]. L'*épithélium* est caractérisé par un empilement de cellules riches en kératine. Lors de la différenciation des kératinocytes, les cellules accumulent des lipides tels que les phospholipides, les céramides et des esters de cholestérol [9]. Grâce aux interactions entre cellules, l'*épithélium* est décrit comme une barrière biologique contre les agressions chimiques et microbiennes, mais aussi comme un moyen de protection contre les réactions inflammatoires [10]. Dans le cas d'une infection bactérienne, l'*épithélium* se reforme pour assurer une intégrité optimale.

Histologiquement, la couche épithéliale de la muqueuse buccale est composée de cellules kératinocytes empilées en 4 strates. Les couches sont décrites de l'intérieur (en contact avec la lame basale) vers l'extérieur (en contact avec le milieu environnant) (Figure 4) [5].

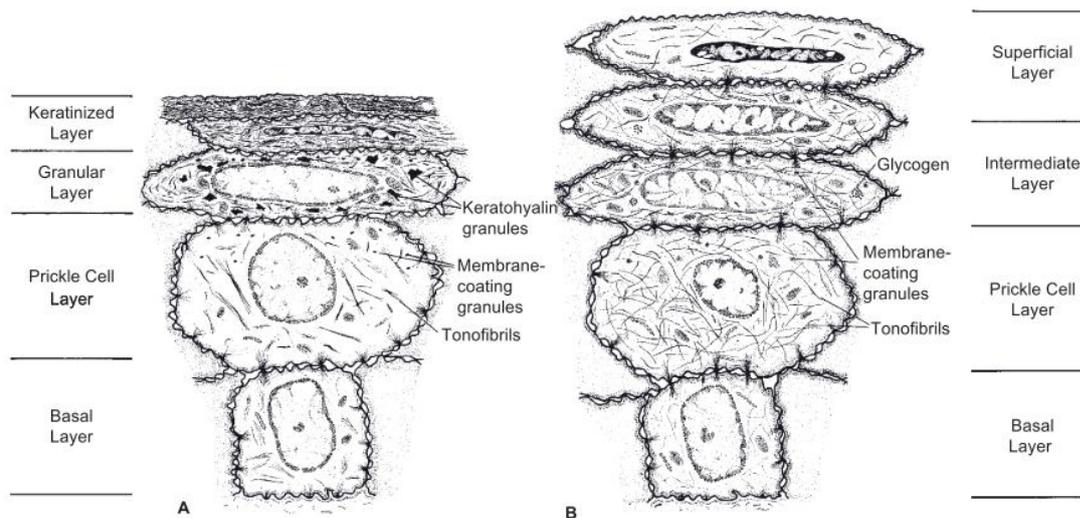


Figure 4: Maturation cellulaire au sein d'un épithélium kératinisé (A) et non kératinisé (B) [8]

- La couche basale

La couche basale est la couche la plus profonde constituée de cellules basales. Cette couche est considérée comme germinative puisqu'elle est le siège de la mitose. Les kératinocytes se multiplient au niveau de cette couche puis migrent progressivement vers la surface. Les cellules basales regroupent deux types de cellules : les cellules germinales, qui autorégulent leur prolifération et les cellules d'amplification permettant de diminuer le nombre de divisions cellulaires afin que le processus de différenciation terminale se mette en place.

- La couche épineuse

Cette couche est le siège de la production de protéines membranaires telle que l'involucrine. Les kératinocytes contiennent des granules de kératosomes impliqués dans la synthèse de lipides et de céramides situés entre les cellules des couches granulaire et cornée. Ces constituants lipidiques constituent une réelle barrière protectrice.

- La couche granuleuse

Au sein de cette couche, les cellules anucléées finalisent leur perméabilisation ainsi que le renforcement de leurs protéines membranaires. Ces squames contiennent des granules de kératohyaline et du glycogène.

- La couche cornée

Les cellules de la couche cornée sont imbriquées par un complexe lipidique et des résidus de desmosomes. Elles sont également dépourvues de jonction cellulaire.

I.C.2.1.1 Les cellules « non-kératinocytes » de l'épithélium buccal

Les mélanocytes, cellules de Merkel, cellules de Langerhans et lymphocytes représentent près de 10% de la population cellulaire de l'épithélium et possèdent la particularité de ne pas participer au phénomène de maturation précédemment décrit [11]. Leurs fonctions sont présentées dans le Tableau 1 ci-après.

Tableau 1: Fonction des cellules "non-kératinocytes" de l'épithélium

Cellules « Non-Kératinocytes »	Fonctions
Mélanocytes	Cellules de production de mélanine, elles sont caractéristiques de la couleur de la muqueuse
Cellules de Langerhans	Dérivées de la moelle osseuse, elles font partie des cellules du système immunitaire porteuses d'antigènes.
Cellules de Merkel	Situées dans la lame basale, elles sont le prolongement dendritique entre les kératinocytes et les cellules de Langerhans et forment des synapses lors d'une éventuelle réponse immunitaire.
Lymphocytes	Associés aux cellules de Langerhans, ils sont capables d'activer les lymphocytes T, afin de répondre au défi antigénique.

I.C.2.1.2 Différences entre l'épithélium masticatoire et l'épithélium alvéolaire

Les *épithélia* sont des tissus non vascularisés composés uniquement de cellules superposées les unes aux autres. Ces cellules sont reliées par des jonctions intercellulaires. Les *épithélia* sont généralement classés suivant le nombre de couche de cellules d'une part, et la forme de ces cellules d'autre part.

Nous retrouvons dans cette classification les *épithélia* simples, composés d'une unique couche de cellules et les *épithélia* stratifiés, composés de plusieurs couches de cellules.

L'épithélium de la muqueuse buccale est un épithélium stratifié kératinisé au niveau des muqueuses masticatoire et non kératinisé au niveau de la muqueuse alvéolaire.

Les couches basales et épineuses sont présentes quel que soit l'épithélium étudié (Figure 4).

Cependant, au sein de l'épithélium kératinisé de la muqueuse masticatoire, la formation de la couche superficielle, riche en kératine, s'effectue via le processus de différenciation cellulaire par kératinisation ou cornéification. Cette couche superficielle contient près de 90% de kératinocytes [3], [5]. La kératine est sécrétée par les kératinocytes issus de la couche basale et

augmente l'imperméabilité et la résistance de l'*épithélium* face aux corps étrangers. En effet, les kératinocytes cuboïdes de la lame basale (ou « cellules germinatives ») deviennent plus grands et plus pâles dès lors qu'ils quittent la couche basale pour former la couche de cellules épineuses. Les cellules de la lame basale deviennent donc supra-basales. La stabilité entre cellules est obtenue par la présence de desmosomes et de tonofilaments en faisceaux, qui s'insèrent aux desmosomes afin de répartir les contraintes liées aux frottements. Les cellules de la couche épineuse migrent vers la surface en s'aplatissant et acquièrent des granules de kératohyaline associés aux tonofilaments. Les cellules supra-basales entreprennent leur différenciation en cellules granulaires et couche cornée. Les filaggrines contenues dans les granules agissent comme une matrice dans laquelle les tonofilaments s'intègrent pour former les cornéocytes [4].

Dans les zones non-kératinisées, telles que la muqueuse alvéolaire, la couche granuleuse est absente. Les cellules de la couche intermédiaire et superficielle conservent leur noyau et leur cytoplasme renferme du glycogène.

I.C.2.2 La membrane basale

Toujours observable au microscope électronique, on retrouve la membrane basale à l'interface de l'*épithélium* et du tissu conjonctif. La perméabilité de la membrane régule les échanges des molécules et tout particulièrement des nutriments entre les tissus. Elle permet également l'attache des kératinocytes et influe sur leur différenciation et leur renouvellement [5].

D'un point de vue structural, le complexe basal est composé d'une première couche la *lamina lucida*, d'environ 45 nm d'épaisseur et qui recouvre la *lamina densa*. Elle contient des glycoprotéines telles que la laminine et l'intégrine. L'intégrine est associée à l'adhésion de la première couche de cellules du tissu épithélial et de la laminine. La couche *lamina densa*, d'environ 50 nm d'épaisseur, est riche en collagène type IV et est également recouverte de protéoglycanes.

I.C.2.3 La lamina propria

La *lamina propria* est une couche de tissu conjonctif essentiellement composée de cellules et d'une matrice extracellulaire (MEC), qui est elle-même composée de fibres et de la substance fondamentale amorphe (SFA). La matrice extracellulaire peut être définie comme un ensemble de macromolécules qui sont produites par des cellules et sécrétées dans l'espace extracellulaire, où elles sont immobilisées par des interactions avec d'autres molécules (Tableau 2).

Tableau 2: Principaux constituants de la lamina propria

Matrice extracellulaire	Fibres : <ul style="list-style-type: none"> • de collagènes • élastiques • de réticuline Substance fondamentale amorphe (SFA) : <ul style="list-style-type: none"> • glycosaminoglycanes (GAG) • protéoglycanes (PG) • glycoprotéines • liquide tissulaire
Cellules	Cellules fixes : <ul style="list-style-type: none"> • fibroblastes • adipocytes Cellules immunitaires : <ul style="list-style-type: none"> • histiocytes/macrophages • mastocytes • leucocytes (granulocytes, monocytes, lymphocytes, plasmocytes)

Cette couche possède une fonction principale de soutien via les fibres et la SFA, mais également un rôle de défense à travers l'action des cellules mobiles et un rôle de nutrition attribué à la présence de SFA. La *lamina propria* permet de nombreux échanges avec l'*épithélium*, notamment la diffusion de nutriments et d'oxygène vers les cellules épithéliales [12]. En cas d'agression mécanique ou bactérienne, c'est au sein de la *lamina propria*, richement vascularisée et innervée que s'exprime la réaction inflammatoire et se mobilisent les défenses immunitaires.

L'organisation histologique de la muqueuse diffère selon le type de muqueuse : masticatoire ou alvéolaire (Figure 3). En effet, le tissu conjonctif au niveau de la muqueuse masticatoire est directement attaché à l'os via un réseau très fibreux tandis que dans le cas de la muqueuse alvéolaire il subsiste une sous-couche d'acides gras et de tissus glandulaires qui contiennent les vaisseaux sanguins et autres nerfs.

I.C.2.3.1 Les fibres du tissu conjonctif

- Les fibres de collagène

Les collagènes constituent un ensemble de 27 types de collagènes regroupés en deux catégories : les collagènes fibrillaires et les collagènes non-fibrillaires [13].

60 % de la fraction protéique de la *lamina propria* est composée de collagènes de type I (91%), de type III (8%) et de type V (moins de 1%) [12], [14]–[17]. D'autres types de collagènes, plus minoritaires, peuvent également être retrouvés, comme les collagènes de type IV et VI [18].

Le collagène de type I est organisé soit en faisceaux larges et denses, soit en réseaux à fibres courtes associées aux collagènes de type III. Le collagène de type III s'organise en réseau

réticulaire près de la membrane basale. Le collagène de type V enrobe les fibres de collagène de type I et III [18].

Le collagènes fibrillaires I et III sont principalement impliqués dans la résistance mécanique de cette couche [19]. Mesuré par des tests de traction in vitro, le module d'Young des fibrilles de collagène de type I dermique est de l'ordre de 32 MPa [20].

Le Tableau 3 répertorie les deux principaux types de collagènes présents dans la muqueuse buccale.

Tableau 3 : Principaux types de collagènes fibrillaires contenus au sein de la lamina propria de la muqueuse buccale

Type	Constitution [19]	Distribution et fonction
I	$[\alpha 1(\text{I})]_2, \alpha 2(\text{I})$	Abondant au sein de la <i>lamina propria</i>
III	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	Présentes autour des vaisseaux sanguins sous forme de fibres réticulaires

Les collagènes de types I et III sont constitués de 3 chaînes polypeptidiques α , elles-mêmes composées d'une succession principale de triplets Gly-X-Y avec Gly correspondant à un résidu de glycine, X étant le plus souvent un résidu de proline (Pro) et Y un résidu de 4-Hydroxyproline (Hyp). La position des acides aminés entraîne la formation d'une chaîne α de conformation hélice gauche, stabilisée ensuite par des liaisons hydrogènes ; ces 3 chaînes α s'assemblent pour former une triple hélice droite.

La Figure 5 résume la biosynthèse du collagène de type I, de la synthèse polypeptidique des chaînes α jusqu'à la fibre de collagène mature.

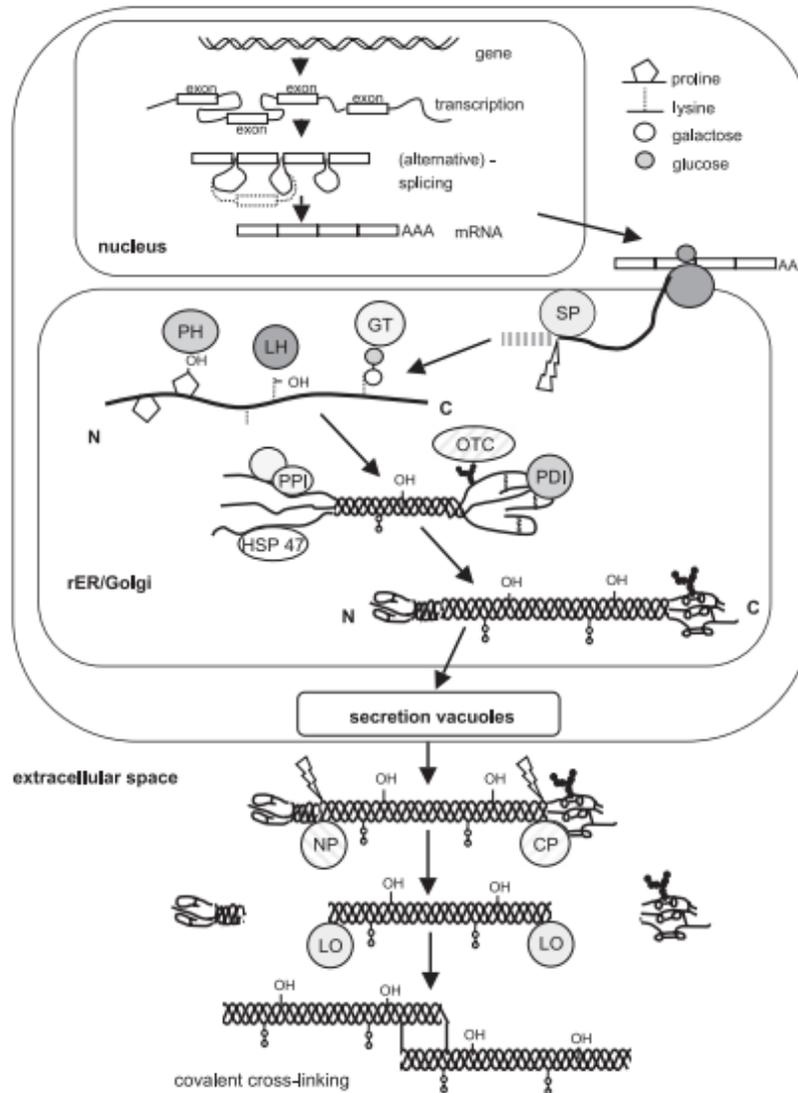


Figure 5: Représentation schématique de la synthèse du collagène [25]

Au sein du réticulum endoplasmique des fibroblastes, les précurseurs de procollagène sont issus de l'association de chaînes α codées par un ou plusieurs gènes. Dans le cas du collagène fibrillaire de type I, la synthèse résulte de la transcription puis de la traduction des gènes COL1A1 et COL1A2 codant respectivement pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ [13]. La taille des chaînes α (extrémité pro-peptidiques comprises) des différents types de collagène varie entre 662 et 3152 acides aminés chez l'Homme.

L'organisation en triple hélice est initialement due à la formation de liaisons hydrogènes directes ou indirectes, généralement liées aux molécules d'eau (Figure 6). La stabilité des triples hélices est ensuite assurée lors de la maturation par la réticulation chimique intra et intermoléculaire des molécules de tropocollagène.

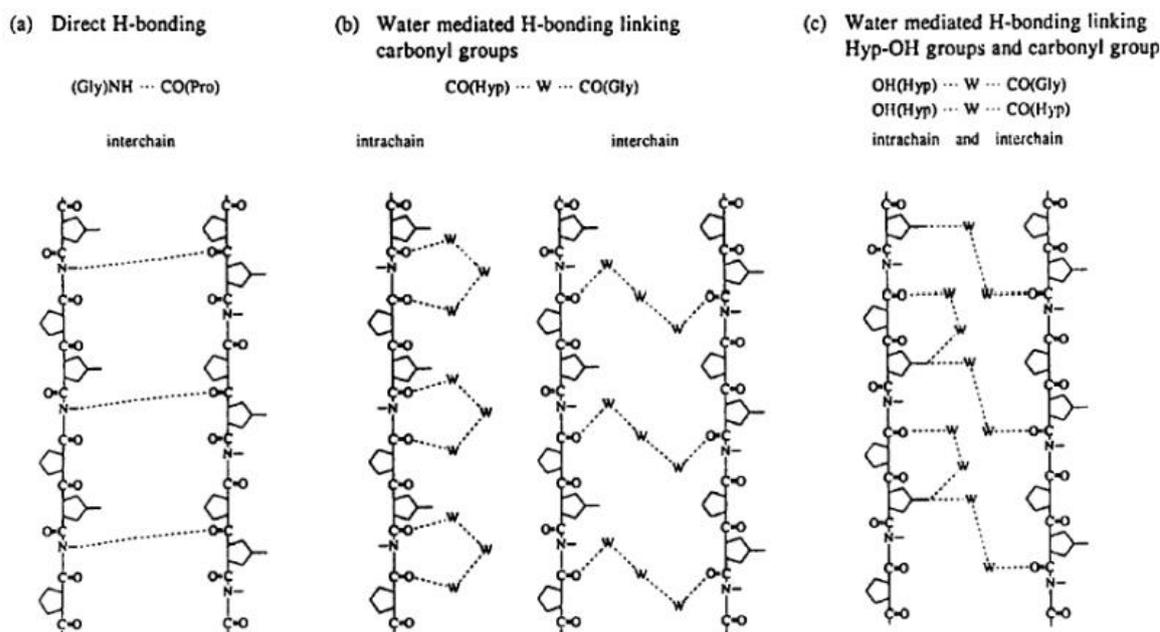


Figure 6: Liaisons hydrogène au sein des chaînes α de procollagène [26]

Les liaisons hydrogène inter-chaînes impliquent un groupement amide (-NH) d'un résidu de glycine et un groupement carbonyle (C=O) d'un résidu de proline. Certaines liaisons hydrogène intra et inter-chaînes indirectes lient les carbonyles de résidus de glycine aux carbonyles des résidus d'hydroxyproline par l'intermédiaire de ponts d'eau.

A la sortie du réticulum endoplasmique et une fois les triples hélices de procollagènes formées, elles sont relarguées dans l'espace extracellulaire. Le clivage enzymatique des propeptides terminaux donne lieu à la molécule de collagène native sous la forme de tropocollagène. La perte des propeptides N et C diminue la solubilité des molécules de tropocollagène.

La structure en triple hélice est stabilisée par des liaisons covalentes inter et intra-chaîne. La formation de ces liaisons covalentes s'effectue par diverses voies de réticulation (enzymatique ou non enzymatique).

La longueur du domaine en triple hélice du collagène de type III est un peu plus élevée que celle du collagène de type I. De plus la proportion légèrement différente en 4-hydroxyproline et glycine augmenterait la sensibilité au clivage protéolytique et engendrerait un turn-over plus rapide des fibrilles de collagène de type III par rapport au collagène de type I [1].

- La réticulation par la lysyl oxydase (LOX)

Parmi les voies de réticulation enzymatique, le pontage par LOX est une des voies principales. Comme visualisé sur la Figure 7(A), par désamination oxydative de la lysine et des résidus d'hydroxylysine, la LOX entraîne la formation des allysines dans les domaines télépeptidiques de la molécule de collagène. Au cours de l'étape (B), le cétaldéhyde interagit avec une allysine ou amine primaire voisine afin de générer un aldéhyde insaturé ou un intermédiaire de base de Schiff (étape C). La phase (D) correspond à la condensation du système qui va générer des liaisons transversales stables liées par covalence.

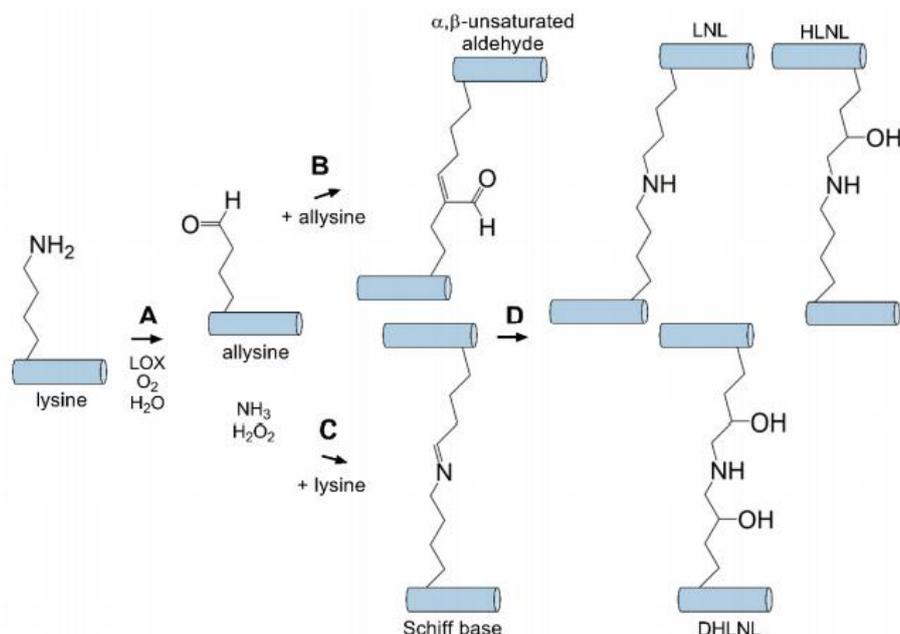


Figure 7: Voie de réticulation enzymatique par la lysyl-oxdase (LOX) [27]

Le dysfonctionnement de l'activité des LOX est impliqué dans de nombreux troubles et maladies inflammatoires [21].

- La réticulation par la transglutaminase

La transglutaminase est également une enzyme participant à la réticulation entre l'acide glutamique et la lysine. Cette réaction va permettre de former un pontage covalent de type Nε(γ-glutamyl)-lysine (Figure 8).

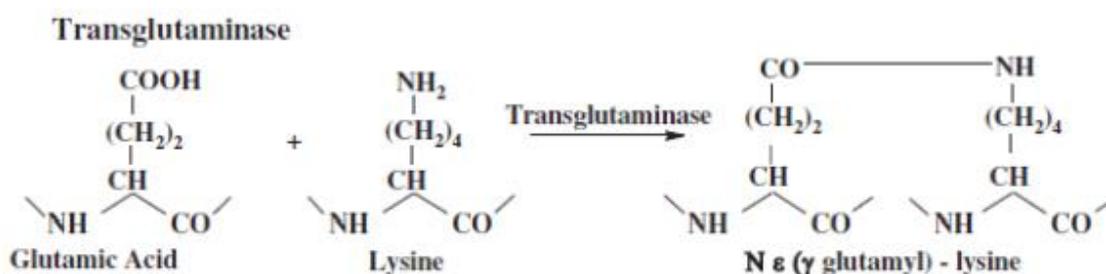


Figure 8 : Voie de réticulation enzymatique par la transglutaminase

- Les ponts disulfures

La Figure 9 présente un autre mécanisme de réticulation enzymatique. Ce type de réticulation n'est observé que pour des molécules de collagènes possédant des résidus cystéines (Cys) tels que le collagène III. Les groupements thiols de la cystéine peuvent s'oxyder en disulfure isomérase en présence d'oxygène, de sels et d'autres agents oxydants. La cystine obtenue résulte d'une liaison covalente entre deux molécules de cystéine et joue le rôle de pont disulfure entre les chaînes polypeptidiques intra ou intermoléculaires [22].

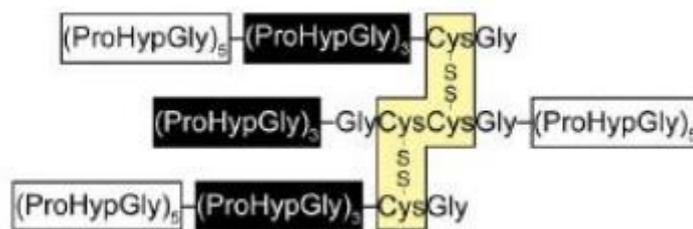


Figure 9 : Voie de réticulation enzymatique par liaisons disulfures dans le collagène de type III

Les molécules de tropocollagène s'assemblent pour former des fibrilles de collagène de l'ordre de 50 nm de diamètre (Figure 10).

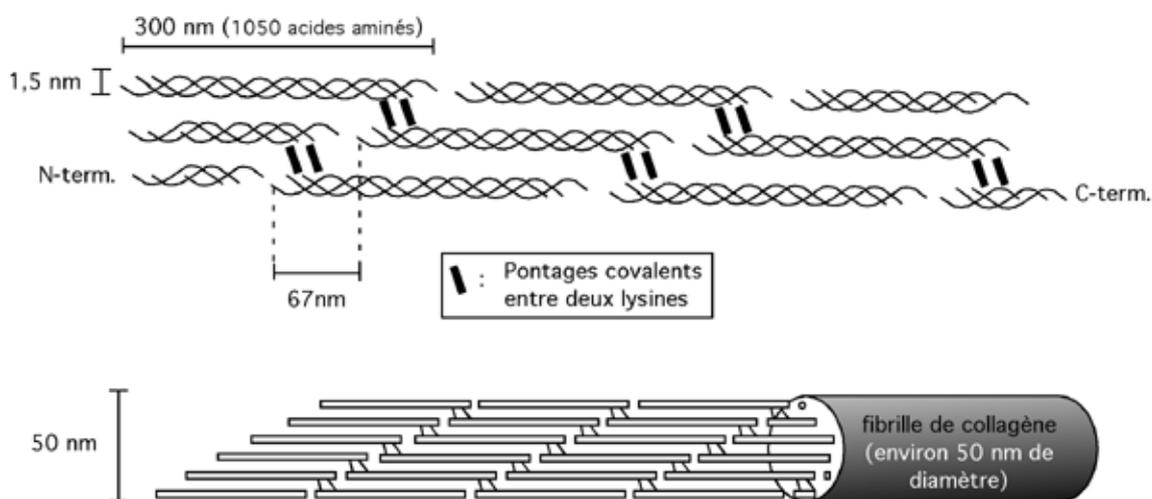


Figure 10: Alignement et dimension d'une fibrille de collagène de type I

- Les fibres élastiques

L'élastine, une autre protéine de structure principale de la matrice extracellulaire, représente moins de 6 % de la quantité totale de protéines dans le tissu gingival humain conjonctif [23].

Les fibres élastiques (0,2 à 2 μm de diamètre) comportent deux composantes morphologiques distinctes. Elles sont composées d'une composante amorphe, l'élastine (90% de la fibre élastique) et d'une phase micro-fibrillaire en périphérie [24]. Le diamètre de chaque microfibrille est de 10 à 20 nm [5].

L'élastine confère l'élasticité au tissu et les micro-fibrilles font office d'échafaudage. Avec un module d'Young de 300 et 600 kPa [25] et un allongement à la rupture supérieur à 100-150%, les fibres élastiques confère leur élasticité caoutchoutique aux tissus conjonctifs [25].

Totalement insoluble dans l'eau, présentant une demi-vie d'environ 70 ans, une grande résistance aux dégradations physico-chimiques et enzymatiques, l'élastine ne se renouvelle pas dans les tissus biologiques sains. Sa stabilité accrue est due à la formation de liaisons croisées

intra et inter-chaînes à partir de résidus de lysine des monomères de son précurseur soluble, la tropoélastine, suite à l'action des lysyl-oxydase (LOX).

La Figure 11 ci-après récapitule la formation des fibres élastiques matures.

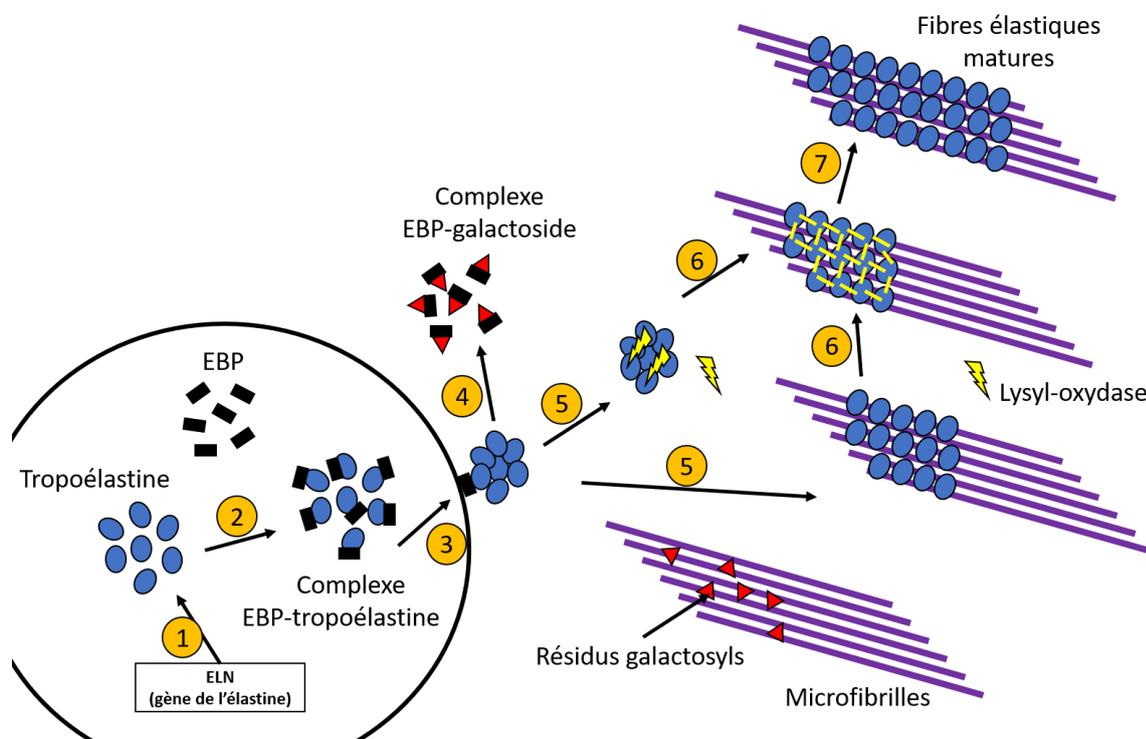


Figure 11: Formation de fibres élastiques matures (figure adaptée de Wise et al [34])

Dans le noyau, la tropoélastine est synthétisée à partir du gène ELN (1). Les monomères sont ensuite fixés à l'EBP (Elastin Binding Protein) afin de générer un complexe pouvant migrer vers l'espace extracellulaire (2). Les molécules de tropoélastine du complexe EBP-tropoélastine interagissent avec les résidus galactosyls initialement présents à la surface des microfibrilles (3). Les galactosyls s'associent aux EBP formant des complexes EBP-Galactoside (4). Les monomères de tropoélastine vont ensuite se détacher de la surface par coacervation et s'accumuler dans le cytoplasme (5). Les coacervats se déposent sur les microfibrilles avant d'être réticulés par les lysyl-oxydases, ou vice-versa (6).

La matrice extracellulaire de la muqueuse alvéolaire est plus riche en élastine que la muqueuse masticatoire. Il est à noter que la proportion d'élastine du tissu conjonctif est plus importante pour les épithéliums non kératinisés. En effet, les épithéliums kératinisés expriment spécifiquement certaines kératines au détriment de la formation d'élastine. La quantité d'élastine est donc variable d'une localisation à une autre [11].

I.C.2.3.2 La substance fondamentale amorphe (SFA)

Les fibres et cellules de la *lamina propria* sont enrobées d'une SFA. L'ensemble forme un gel compressible, permettant la circulation de l'eau et des molécules dissoutes. Ce gel sert également de réservoir de facteurs de signalisation cellulaire pour des fonctions diverses comme la migration ou la prolifération. Les protéines de structure telles que les collagènes ou l'élastine interagissent avec les protéoglycanes et les glycoprotéines environnantes.

- Les protéoglycane (PG) et glycoaminoglycane (GAG)

Les protéoglycane (PG) sont des macromolécules à double nature chimique. La biosynthèse d'un PG débute par la formation de la protéine centrale « core protein » constituée de près de 2200 acides aminés. Un tétraholoside (GlcA-Gal-Gal-Xyl) des GAG est ensuite greffé par liaison covalente entre le groupement hydroxyle de certaines sérines de la « core protein » et leur xylose. Les protéoglycane se distinguent donc les uns des autres par la séquence de la protéine ainsi que par le nombre et la longueur et la nature des GAG liés.

Différents types de GAG (autres que l'acide hyaluronique) peuvent être greffés à une seule et même « core protein » (Figure 12). Les GAG sont des polysaccharides complexes, linéaires non ramifiés. Ils sont chargés négativement et sont capables de fixer les molécules d'eau, par la présence de composés sulfatés et carboxylates. Suivant la nature de l'unité disaccharidique et le degré de sulfatation, ils peuvent être classés en cinq groupes principaux : le sulfate de chondroïtine (CS), l'héparine/héparane sulfate (HS), le sulfate de dermatane (DS) et le sulfate de kératane (KS) et l'acide hyaluronique (HA).

Les GAG ont la capacité d'interagir avec de nombreuses protéines, facteurs de croissances et autres récepteurs cellulaires. Les trois principaux GAG de la muqueuse buccale des mammifères sont le 4-sulfate de chondroïtine (10%), le sulfate de dermatane (53%) et l'acide hyaluronique (30%) [26]. Leurs fonctions biologiques respectives sont présentées dans le Tableau 4.

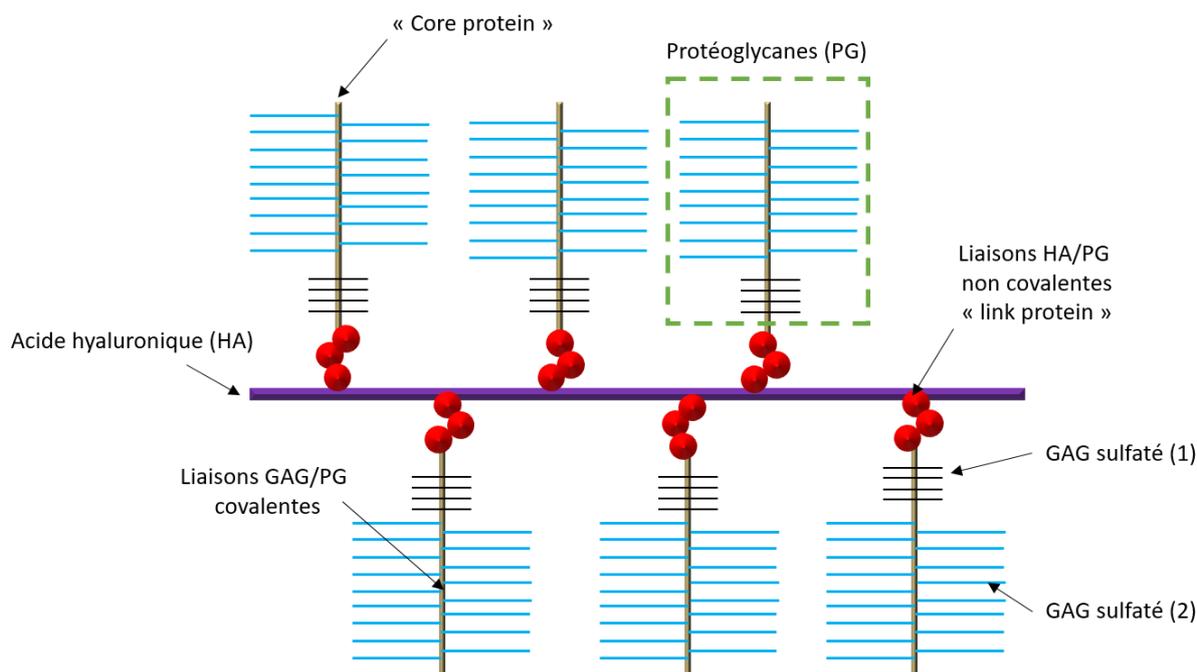
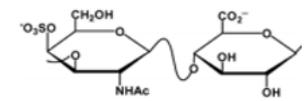
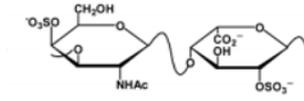
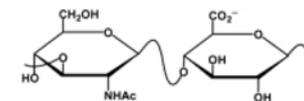


Figure 12: Schéma d'un agrégat de protéoglycane

Tableau 4: Description des principaux GAG de la lamina propria buccale

Type de GAG	Unité disaccharidique	Fonction biologique
Sulfate de Chondroïtine (CS)	 <p>Chondroïtine sulfate A (Chondroïtine-4-sulfate)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Prévention de l'inflammation [27] Régulation de l'adhésion des cellules à la MEC [27]
Sulfate de dermatane (DS)	 <p>Dermatan sulfate (Chondroïtine sulfate B, - 2, 4-sulfate)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Organisation des collagènes [28] Régulation des interactions cellules/cellules et cellules/matrices [29]
Acide hyaluronique (HA)	 <p>Hyaluronic acid</p>	<ul style="list-style-type: none"> Stabilisation des tissus conjonctifs [30] Organisation de la MEC [30] Hydratation et équilibre hydrique [30]

- Les glycoprotéines

Les glycoprotéines sont constituées de chaînes polypeptidiques ramifiées auxquelles sont greffées de courtes chaînes glucidiques [31]. Au sein des tissus de la cavité buccale, les principales glycoprotéines retrouvées sont la fibronectine et la tenascine. Grâce à leurs sites d'interaction, elles jouent un rôle dans la cohésion des cellules du réseau matriciel et notamment dans la liaison des cellules aux protéoglycanes et aux collagènes [5].

I.C.2.3.3 Les cellules du tissu conjonctif

La lamina propria contient une large variété de cellules telles que les fibroblastes et les cellules immunitaires.

- Les cellules fixes : fibroblastes

Les fibroblastes sont les principales cellules de la lamina propria. Elles synthétisent les différents constituants de la substance fondamentale de la lamina propria et jouent un rôle clé dans la production et le renouvellement des fibres de la matrice extracellulaire. Lors de la cicatrisation, le nombre de fibroblastes augmente ; ils deviennent contractiles afin de participer à la réparation des tissus. Les fibroblastes gingivaux représentent 65% des cellules du tissu conjonctif. Les composants de la MEC sont spécifiques des fibroblastes qui les produisent. En effet, les fibroblastes gingivaux synthétisent moins de collagène de type III et V comparativement au derme [32]. L'élastine est également moins abondante que les fibres de collagène dans le tissu conjonctif buccal. Les fibroblastes sont également impliqués dans les processus inflammatoires en sécrétant de nombreux médiateurs inflammatoires tels que les cytokines.

- Les cellules immunitaires

Parmi les cellules immunitaires, on distingue les cellules initialement localisées dans le tissu conjonctif et les cellules provenant du sang, migrant vers le foyer inflammatoire. Le Tableau 5 présente les principaux acteurs de la défense immunitaire [3][33].

Tableau 5: Fonction des cellules immunitaires de la lamina propria

Cellules initialement localisées dans le tissu conjonctif	
Les mastocytes	Les mastocytes sont de grandes cellules mononuclées principalement situées à proximité de la couche basale, des vaisseaux sanguins et des nerfs du tissu conjonctif. Ils se caractérisent par la présence de granules d'héparine et d'histamine dans le cytoplasme. Les mastocytes jouent un rôle important dans le développement de l'inflammation et notamment lors des processus de cicatrisation.
Les macrophages	Les macrophages ont pour rôle d'ingérer les tissus endommagés et de produire des cytokines, stimulant la prolifération des fibroblastes et donc la production de fibres de la matrice extracellulaire. Il existe deux types de macrophages au sein de la muqueuse buccale : le mélanophage et le sidérophage. Le premier ingère les granules de mélanine extrudés par les mélanocytes de l'épithélium. Le sidérophage contient de l'érine dérivée de globules rouges issus de tissus à la suite d'une blessure mécanique
Cellules initialement localisées dans le sang	
Les polynucléaires	Ces cellules synthétisent des enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans la phagocytose d'agents pathogènes (bactéries, cellules nécrosées...).
Les lymphocytes et plasmocytes	Ils sont impliqués dans l'immunité humorale et cellulaire. Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes et activent les lymphocytes B. Une fois activés, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes, qui fabriquent des anticorps pour combattre les infections.

I.D Le milieu environnant : la salive

La salive est le fluide biologique le plus abondant au sein de notre organisme. Environ 1 litre de salive est sécrété par jour par différentes glandes salivaires réparties dans la cavité buccale. On distingue 2 types de glandes salivaires : les glandes salivaires principales (parotide, sous maxillaire et sublinguale) dont la sécrétion est réflexe et prandiale et les glandes salivaires accessoires disséminées au sein de la muqueuse buccale (lèvres, langue, palais) dont la sécrétion est continue. Lorsqu'est réalisé un prélèvement salivaire, c'est l'ensemble des sécrétions des différentes glandes qui est prélevé et dénommé salive totale. La salive mixte correspond à la salive recueillie par expulsion puis centrifugée pour éliminer les éléments en suspension tels que les bactéries, débris alimentaires et cellules desquamées de l'épithélium buccal.

I.D.1. Composition de la salive

La salive, composée d'eau à 95-99%, contient de nombreux composés indispensables au maintien de l'intégrité physiopathologique de la cavité buccale [34]. La sécrétion salivaire se traduit par la présence de composés inorganiques anioniques et cationiques ainsi que d'une phase organique apportant au bio-fluide un grand nombre de propriétés physico-chimiques.

I.D.1.1 Eléments inorganiques

I.D.1.1.1 Composés gazeux

La salive est riche en eau, mais comme tout fluide, elle contient divers composés gazeux dissous tels que l'oxygène (0,2%), l'azote (0,9%) et le dioxyde de carbone. Ce dernier représente 20-30% du volume salivaire. Une partie du CO₂ est liée aux protéines tandis que l'autre partie est libre et en équilibre avec le carbonate et l'acide carbonique, assurant le maintien du pH salivaire via le pouvoir tampon.

I.D.1.1.2 Composés électrolytiques

De nombreux électrolytes sont présents dans la salive. Le Tableau 6 ci-après reporte la concentration des différentes espèces ioniques contenues dans la salive mixte.

Tableau 6: Composition non organique de la salive mixte [43]

Salive mixte	Concentrations ioniques (mmol/l)
Na⁺ (Sodium)	5,8
K⁺ (Potassium)	19,5
Ca²⁺ (calcium)	1,32
Cl⁻ (Chlore)	16,4
HCO₃⁻ (Bicarbonates)	5,5
Phosphates inorganiques	5,7
SCN⁻ (Thiocyanates)	0,7

I.D.1.2 Eléments organiques

Parmi les 0,3% de composés organiques de la salive, les protéines en sont les principaux [35]. Les protéines salivaires sont notamment classées suivant deux catégories : les protéines extrinsèques (provenant du sang par diverses voies de diffusion et de transport) et intrinsèques (synthétisées localement par les glandes salivaires).

I.D.1.2.1 Les protéines extrinsèques

Les protéines extrinsèques sont issues plus généralement du système immunitaire. On retrouve parmi elles les albumines d'origine sérique (5-10% des protéines totales), les immunoglobulines de type Ig A, Ig G, Ig M et les α -et β -globulines.

Ces dernières représentent 20% des protéines totales et assurent une défense immunitaire vis-à-vis de l'adhésion des micro-organismes bactériens au sein de la cavité buccale [36].

I.D.1.2.2 Les protéines intrinsèques

Les protéines intrinsèques sont synthétisées par les glandes salivaires. On y retrouve notamment les enzymes salivaires, les protéines riches en proline ainsi que les mucines.

- Les enzymes salivaires

Les enzymes jouent un rôle essentiel dans la dégradation des nutriments et la protection microbienne.

L'enzyme α -amylase représente près de 30% des protéines de la salive totale. Elle participe à la dégradation des amidons alimentaires par hydrolyse des liaisons glucidiques [35]. La lipase salivaire permet d'hydrolyser les triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol [37]. Le lysozyme présente un pouvoir antiseptique et agit comme une enzyme capable de lyser les parois bactériennes [37]. Les peroxydases favorisent l'oxydation du thiocyanate par l'eau oxygénée, en générant un composé très oxydant qui dénature et empêche la croissance microbienne [35]. D'autres enzymes d'origine tissulaire, comme les collagénases, gélatinases, élastases participent également à une meilleure digestion des composés et une protection microbienne [37].

- Les protéines riches en proline

Les protéines riches en proline (PRP) représentent 70% du total des protéines salivaires sécrétées par les glandes parotidiennes et submandibulaires. Elles sont caractérisées par la prédominance de l'acide aminé proline. Les PRP acides contribuent au maintien de la calcémie alors que les PRP basiques maintiennent la lubrification de la cavité buccale [35].

Les mucines constituent environ 16% des protéines intrinsèques. Ce sont des glycoprotéines constituées d'une fraction protéique (75%) et d'hydrates de carbone (25%). Ce complexe va polymériser en présence d'eau afin de former une pellicule visqueuse à la surface de la muqueuse buccale. Ce film sous forme de gel participe grandement à la lubrification de la cavité buccale mais également à la protection de celle-ci vis-à-vis des bactéries et des aliments ingérés [35]. Il existe deux types de mucines : les MG1, à poids moléculaire élevé et les MG2, à bas poids moléculaire. La viscosité salivaire est proportionnelle au taux de mucines. Elle varie selon la localisation du prélèvement et du débit salivaire [37].

- Les facteurs de croissance

Des facteurs de croissance tels que les « Nerve Growth Factor » NGF et « l'Epithelial Growth factor » EGF ont été détectés dans les glandes salivaires chez des patients atteints de maladies parodontales [37]. Bien que ces hormones salivaires soit majoritairement issues de la circulation sanguine, la production locale de ces facteurs de croissance est observable au niveau de la glande submandibulaire [38].

I.D.1.2.3 Les autres composants

Les glandes salivaires peuvent sécréter des hormones qui ont pour rôle de moduler la synthèse des protéines. Parmi ces hormones, on retrouve les stéroïdes et des hormones peptidiques.

Faiblement concentrée dans la salive, l'urée en tant que substrat pour la synthèse d'ammoniac permet d'augmenter le pH [37]. L'acide urique [39] et l'acide ascorbique [40], considérés comme des biomarqueurs de défense contre le stress oxydatif, sont retrouvés en faible quantité chez des patients atteints de lésions buccales.

Enfin, des traces d'ARN, de lipides et de glucose issus de cellules de l'organisme ou de micro-organismes extérieurs sont également retrouvés dans le bio-fluide.

I.D.2. Rôle de la salive

- La lubrification

La lubrification de la muqueuse buccale est assurée principalement par les mucines et les protéines riches en proline. La sécrétion de ces protéines limite grandement la déshydratation de la cavité buccale dès lors que l'on respire et permet également d'améliorer la fonction masticatoire, en assurant la constitution du bol alimentaire [35], [37], [41], [42].

- La protection des tissus

La salive constitue un biofluide qui protège les muqueuses contre les agressions extérieures (mécaniques, thermiques ou chimiques). Le biofluide permet également d'empêcher lors des prises alimentaires le contact direct entre les éléments chimiques extérieurs, en particulier les acides, les hydrates de carbones et la surface de la dent [35], [37], [41], [42].

- Le pouvoir tampon

Le pouvoir tampon de la salive permet de maintenir l'équilibre de la flore buccale, d'éviter la prolifération bactérienne et de favoriser la cicatrisation. En effet, les bicarbonates, les composés phosphatés et certaines enzymes ont la capacité de réguler le pH et de protéger la cavité buccale par neutralisation des acides et par synthèse d'ammoniac [35], [37], [41], [42].

- Rôle antimicrobien

L'activité antimicrobienne de la salive repose sur la présence d'agents immunologiques tels que les IgA, IgG et IgM. Ceux-ci vont interagir avec les éléments pathogènes afin de procéder à leur reconnaissance, limiter leur prolifération pour aboutir à leur élimination. Les enzymes et la mucine jouent également un rôle barrière antimicrobien [35], [37], [41], [42].

I.E Vieillessement cutanéomuqueux

Le vieillissement, par définition, est un ensemble de processus physiologiques et psychologiques modifiant la structure et les fonctions de l'organisme à partir de l'âge mûr. Il est la résultante des effets intriqués de facteurs génétiques, chronologiques et endocriniens (vieillessement intrinsèque) et de facteurs environnementaux (vieillessement extrinsèque) auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie. Il s'agit d'un processus lent et progressif qui doit être distingué des manifestations des maladies. L'état de santé d'une personne âgée résulte habituellement des effets du vieillissement et des effets additifs de maladies passées (séquelles), actuelles, chroniques ou aiguës.

La longévité d'un être vivant représente la durée de vie biologiquement et génétiquement programmée, dans les conditions idéales en l'absence de maladies ou de facteurs d'agressions externes. Cette durée de vie est variable d'un individu à un autre et est fortement modifiée par les facteurs environnementaux. En 1997, Rowe et Kahn ont distingué le vieillissement « pathologique » comme étant un processus à part entière [43]. Le vieillissement résulte-t-il de l'évolution des systèmes physiologiques, indépendamment des circonstances pathologiques ou s'agit-il de l'évolution des systèmes, compte tenu des pathologies associées ?

I.E.1. Vieillessement intrinsèque

Le vieillissement chronologique se caractérise par la diminution des capacités réparatrices de l'organisme avec l'âge. Il ne s'agit en aucun cas d'une maladie. Avec le temps, il a été observé de nombreux événements tels que :

- la diminution de l'espérance de vie des cellules [44],
- la dégradation des fonctions de la cellule par le raccourcissement des régions terminales des chromosomes [45],
- La diminution de la biosynthèse des protéines, les dysfonctionnements des mitochondries et les modifications de l'activité enzymatique causant l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [46],
- L'altération de la régulation du système immunitaire [47].

Si nous prenons l'exemple de la peau, il a notamment été observé une diminution de l'épaisseur cutanée chez les sujets âgés, une sécheresse accrue et l'apparition de rides. Parmi les principaux composants de la peau et des muqueuses, les fibres de collagènes ainsi que les fibres élastiques font l'objet de modifications moléculaires irréversibles durant le vieillissement intrinsèque [48].

Au sein des tissus buccaux, les études histologiques ont montré la diminution de l'épaisseur de l'*épithélium* avec l'âge [49]. Cette diminution s'accompagne d'une réduction de la kératinisation, d'une augmentation de la perméabilité des agents bactériens, d'une diminution de la résistance aux lésions, d'un aplatissement des crêtes épithéliales et basales, d'une diminution de la densité cellulaire [50] [49].

Au niveau de la couche *lamina propria* des muqueuses buccales, une augmentation de la densité de fibres et une modification de l'adhésion cellulaire avec l'âge sont à noter selon Akimoto et al [51]. De plus, il a été observé une désorganisation de la composante fibreuse, se traduisant par une augmentation de la réticulation des fibres via des processus de réticulation non-enzymatique [49]. Le collagène devient ainsi insoluble et très résistant d'un point de vue mécanique [52].

Le flux salivaire est indispensable à l'écosystème buccal et joue un rôle mécanique essentiel. Avec le vieillissement chronologique, il a été observé une atrophie progressive du parenchyme salivaire chez les sujets de plus de 50 ans, un vieillissement du système nerveux dont dépendent les glandes salivaires ainsi qu'une variation de la composition de la salive. Le fluide salivaire devient plus épais par augmentation des mucines, moins riche en immunoglobulines et plus rare par diminution de la sécrétion. La femme âgée est davantage touchée par les problèmes de sécheresse buccale en raison du facteur hormonal et d'un faible volume des glandes salivaires.

Différentes théories ont été proposées afin d'expliquer le vieillissement intrinsèque des tissus cutanéomuqueux :

- La théorie des radicaux libres,
- La théorie des produits de glycation avancée,
- La théorie de l'« inflammaging »,
- La théorie des télomères.

I.E.1.1 La théorie des radicaux libres

Proposée par Harman en 1956 [53], [54], la théorie des radicaux libres repose sur les effets délétères des radicaux libres sur les constituants cellulaires, en particulier ceux de la matrice extracellulaire.

De manière générale, les radicaux libres sont très largement impliqués dans le processus du vieillissement. Chez de nombreuses espèces (animales ou végétales) l'oxygène est indispensable à la production d'énergie. La phosphorylation oxydative (ATP) est une production d'énergie s'effectuant par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries. Durant ce processus, la réduction électronique de l'oxygène en eau donne naissance à des radicaux primaires ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) encore appelés « Reactive Oxygen Species » (ROS)). Au cours de ce processus, la production des radicaux libres engendre l'oxydation des molécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides [55].

Les radicaux libres (comme le radical hydroxyle HO• et le radical superoxyde O₂•⁻) ainsi que les dérivés non radicalaires (tels que l'acide hypochloreux (HOCl) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)) sont des espèces qui vont altérer les fonctions tissulaires et cellulaires des systèmes biologiques, en dénaturant de manière irréversible et directe les molécules de la matrice extracellulaire. Les ROS agissent aussi de façon indirecte, en conduisant à la surexpression des métalloprotéinases, impliquées dans la dégradation de l'ensemble des composés de la matrice extracellulaire comme les collagènes et l'élastine. Les ROS sont donc nuisibles et participent à la sénescence et au développement de pathologies [56], [57].

Afin de contrer les effets néfastes des entités radicalaires et dérivés oxydatifs, l'organisme se défend à l'aide d'antioxydants, telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx) [58].

Au sein de la cavité buccale, la salive contient des antioxydants non enzymatiques tels que l'acide urique, l'albumine et l'acide ascorbique. L'acide urique étant majoritaire, il s'agit d'un biomarqueur salivaire fiable dans la surveillance du stress oxydatif [58]. Lorsque le taux de molécules oxydantes est en excès par rapport aux molécules générées lors de la défense de l'organisme, on parle de stress oxydatif. Le déclin de ces espèces antioxydantes avec l'âge va provoquer le développement des radicaux libres. Durant le vieillissement, l'organisme est dans l'incapacité de neutraliser l'excès de radicaux libres.

Le stress oxydatif joue ainsi un rôle important dans le processus du vieillissement, mais aussi dans le développement des maladies chroniques. Le lien direct entre les radicaux libres, le stress oxydatif et les états inflammatoires a été étudié notamment dans le cadre d'analyses des mécanismes pathologiques de la cavité buccale [58].

La colonisation bactérienne due à la présence de biofilm (hygiène déficiente) favorise l'inflammation gingivale et les maladies parodontales et entraîne une augmentation de la production de ROS [59]. De plus, l'action délétère des ROS est accentuée chez les patients atteints de maladies parodontales qui ont un système de défense antioxydant affaibli [60].

I.E.1.2 Les produits de glycation avancée (AGE)

Le mécanisme de modification des protéines suite à la fixation de sucres a été décrit par Maillard (1912). La réaction de « Maillard » repose sur un processus non enzymatique qui se produit entre un ose (glucose, galactose ou fructose) et la fonction amine libre d'une protéine (lysine ou arginine par exemple). Ces réactions sont responsables de l'altération des propriétés structurales et fonctionnelles des protéines, conduisant à la formation de composés spécifiques appelés « produits finaux de glycation » ou AGE (Advanced Glycation End-product) [48], [57].

La Figure 13 présente les trois voies conduisant à la formation des AGE : la glycation, la glycoxydation et la voie des polyols [61].

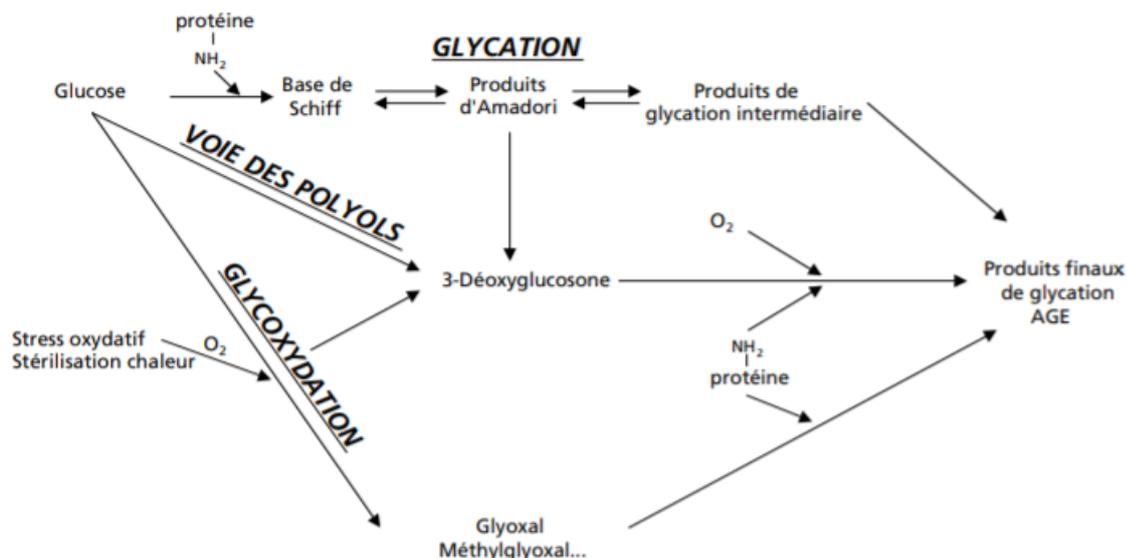


Figure 13: Formation des AGE (adapté de la revue de Boulanger et al [61])

- La voie par glycation s'effectue dans un premier temps par la condensation du groupe aminé et d'un groupe carbonyle formant une base de Schiff. Ce réarrangement moléculaire conduit à la formation de produits d'Amadori, puis par transformation ultérieure aux produits de glycation finaux.
- Durant la glycoxydation, le glucose s'auto-oxyde en formant le glyoxal ou le méthylglyoxal. Ces derniers réagissent avec les groupements des amines libres des protéines pour finalement former les AGE.
- Par voie des polyols, la réaction entre le glucose et les enzymes tels que l'aldose-réductase permet également d'obtenir des produits de glycation intermédiaires réagissant avec les groupes aminés pour former les AGE finaux.

Les principaux AGE répertoriés sont les suivants : N-(carboxyalkyl/lysine), N-(carboxyméthyl/lysine), N-(carboxy) éthyl/lysine, Imidazole, Glyoxal lysine dimère (Gold) ou encore Méthylglyoxal lysine dimère (Mold).

La modification des chaînes latérales de lysine ou d'arginine suite à la fixation des oses génère un encombrement stérique et dans certains cas la formation de pontages intramoléculaires entre deux molécules constitutives de la protéine. Prédominants au sein de la matrice extracellulaire, les AGE se retrouvent entre les zones en triple hélice des molécules des fibres de collagène. Le processus de réticulation du collagène avec l'âge est représenté en Figure 14.

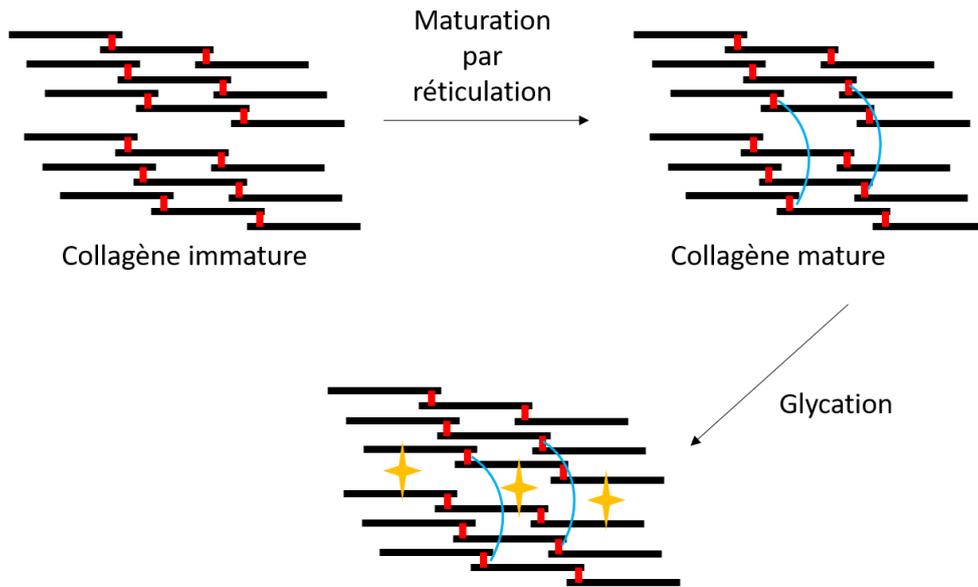


Figure 14: Processus de réticulation des fibres de collagène par glycation

La glycation des protéines de la matrice extracellulaire est reconnue comme l'une des principales causes de modification des propriétés mécaniques des tissus. Ce type de réaction entraîne principalement une rigidification des fibres de collagène.

La Figure 15 résume l'influence des AGE sur le profil de réticulation des fibres en fonction de la maturité du tissu biologique et sur l'augmentation de la résistance à la traction des fibres.

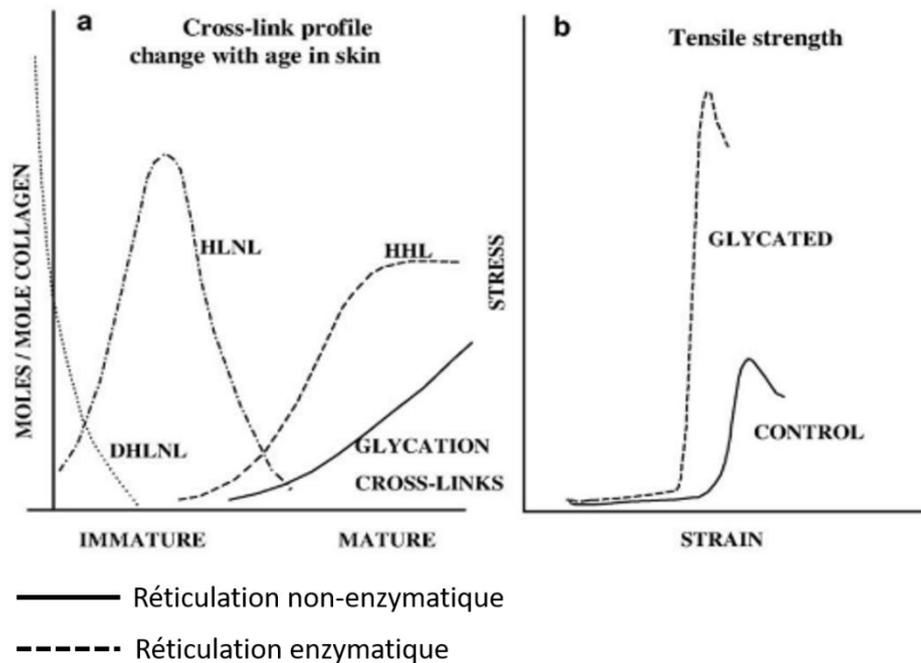


Figure 15: Effets du processus de réticulation sur les fibres de collagènes issus d'échantillon de peau (extrait de [57])

En effet, sur la Figure 15a) on observe une augmentation du profil de réticulation non-enzymatique avec l'âge. En Figure 15b), il est à noter une augmentation de la résistance mécanique de la fibre de collagène avec la réticulation par glycation.

De plus, le diamètre et l'irrégularité des fibres de collagènes glyquées augmente, entraînant une désorganisation du réseau fibrillaire et une diminution de l'interaction entre protéines matricielles [62]. Les AGE ont également un rôle sur la modification de la réactivité des fibres de collagènes avec les cellules de la matrice extracellulaire. En effet, la perte des liaisons physiques entre les résidus d'arginine et les intégrines cellulaires entraîne une déficience en terme d'intégrité tissulaire et de cicatrisation [63].

I.E.1.3L'« inflammaging »

La théorie de l'« inflammaging », proposée par Franceschi et *al* en 2000, a montré que le vieillissement des organismes biologiques est caractérisé par un état inflammatoire chronique [64]. Cet état chronique peut être associé aux multiples pathologies développées chez les patients âgés.

L'inflammation est un mécanisme de défense naturel et bénéfique à l'intégrité de l'organisme. La réaction inflammatoire est déclenchée par une agression (coupure avec brèche vasculaire ou présence d'agents pathogènes). Quel que soit le facteur déclencheur, l'inflammation se déroule dans les tissus vascularisés, comme les tissus conjonctifs. Bien que sollicités durant l'inflammation, les tissus épithéliaux constitutifs des muqueuses sont dépourvus de vaisseaux et sont donc dans l'incapacité de développer une réponse inflammatoire directe. Etant à proximité du site inflammatoire, ils peuvent cependant être réparés durant la phase terminale de l'inflammation. Les échanges sont rendus possibles aux abords de la membrane basale, qui sépare l'épithélium du tissu conjonctif.

La réaction inflammatoire se manifeste en trois séquences d'événements complexes : la phase d'initiation, la phase d'amplification et la phase de réparation tissulaire.

- Durant la phase d'initiation, de nombreux médiateurs solubles présents dans le sang sont activés, permettant de donner l'alerte et de recruter les cellules de l'immunité sur le site inflammatoire.
- La phase d'amplification repose sur la phagocytose et la destruction des agents pathogènes par les cellules du système immunitaire.
- La phase de réparation tissulaire implique la production de protéines de la matrice extracellulaire (en particulier le collagène, la fibronectine et la laminine) par les macrophages et fibroblastes.

La réponse inflammatoire aiguë correspond à la réponse immédiate à un agent agresseur sur une courte durée et se déroule généralement comme précédemment décrit. L'altération de la régulation du système immunitaire peut engendrer une inflammation dite « chronique ». La réaction inflammatoire est maintenue et entretenue par les médiateurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires) en l'absence de stimulus externe déclencheur. L'inflammation chronique se caractérise par une réaction n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée, elle évolue et persiste dans le temps.

Parmi les principales cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages des tissus, on retrouve le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6. L'équilibre entre les facteurs pro et anti-inflammatoires n'est plus assuré au cours du vieillissement (Figure 16).

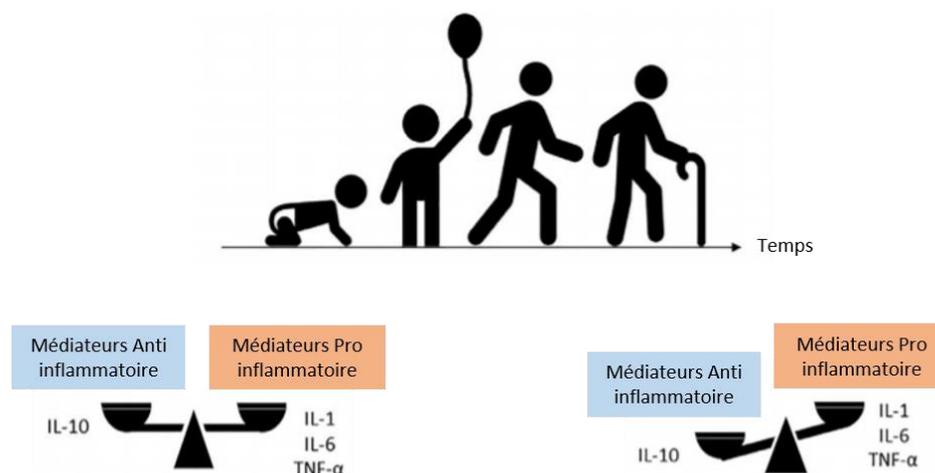


Figure 16: Processus d'immunosénescence au cours du vieillissement [75]

En effet, il a été démontré d'une part le déclin de la réponse immunitaire face aux agents pathogènes et d'autre part une augmentation accrue des cytokines pro-inflammatoires chez les patients atteints de pathologies associées au vieillissement [65].

Il existe également un lien étroit entre le stress oxydatif et l'inflammation. En effet, la présence d'antioxydants diminue le stress oxydatif et prolonge la durée de vie du système immunitaire. L'inflammation est associée à une surpopulation de ROS, endommageant les composants cellulaires [66]. Plusieurs travaux ont récemment mis en lumière l'interrelation entre la parodontite chronique et d'autres maladies chroniques répandues telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer et les maladies respiratoires chroniques [67].

I.E.1.4 La théorie des télomères

La sénescence répliquative est un processus physiologique défini par la perte des capacités de division cellulaire liée à un raccourcissement des séquences d'acides nucléiques (TTAGG) situées aux extrémités des chromosomes appelés télomères. Les études menées par Hayflick [68] montrent que le raccourcissement du matériel génétique des fibroblastes est associé à la perte de capacité de ces cellules à se renouveler avec l'âge du donneur. Les télomères représentent ainsi un marqueur de la durée de vie moléculaire.

Dans le derme humain, les fibroblastes sénescents génèrent une quantité élevée de métalloprotéases pouvant dégrader les collagènes [69]. De récentes études démontrent que la sénescence cellulaire serait provoquée par de nombreuses lésions de l'ADN [70], [71]. Ces phénomènes sont à l'origine d'une diminution de la densité cellulaire se traduisant par une diminution de l'activité mitotique [72] et donc par un ralentissement de la régénération cellulaire.

I.E.2. Vieillesse extrinsèque

Le vieillissement extrinsèque affecte la durée de vie des organismes biologiques et se superpose au vieillissement intrinsèque (inélucltable). Il fait intervenir des facteurs externes. Si l'on prend l'exemple de la peau, 80 % du vieillissement extrinsèque est attribuable à l'exposition au soleil [73]. Le photo-vieillesse accentue grandement les signes visibles du vieillissement intrinsèque de la peau.

Chez les personnes âgées et/ou atteintes de pathologies générales, l'édentement est compensé par le port de prothèse dentaires, considéré comme principal facteur du vieillissement extrinsèque [74]. Du fait de leur conception, le contact étroit et prolongé de l'intrados prothétique avec la muqueuse buccale, et la transmission des forces occlusales à travers la prothèse entraînent à plus ou moins long terme une fragilisation des tissus de soutien [75], [76], [77]. Le port de prothèse dentaire a manifestement une influence sur la réduction de l'épaisseur de l'*épithélium* buccal par un raccourcissement des crêtes épithéliales. L'*épithélium* devient donc plus vulnérable à la pression [78].

La présence d'inflammation ou de pathologies associées aux muqueuses compliquent d'avantage l'intégration biomécanique des prothèses dans la sphère orale [79]. La sécheresse buccale, récurrente en gériatrie, est aggravée par certaines pathologies générales et la prise de traitement médicamenteux. Elle entretient l'inflammation locale chronique illustrée par la stomatite sous prothétique et accentue la sensation d'inconfort lors du processus de mastication chez le porteur de prothèses [74], [80], [81].

Les tissus muqueux sont également exposés à d'autres facteurs environnementaux tels que la consommation de tabac, une mauvaise alimentation et les bactéries issues d'une mauvaise hygiène bucco-dentaire [67], [81].

I.F Caractérisation physico-chimique

Selon le National Institute of Health [82], un biomarqueur est mesuré et évalué comme un indicateur de procédés biologiques normaux ou pathologiques. Depuis quelques années, le terme biomarqueur est devenu de plus en plus courant dans les écrits scientifiques, bien qu'il ne s'agisse pas d'un concept novateur. En effet, les indicateurs les plus connus sont les paramètres biochimiques et/ou moléculaires recherchés dans un tissu (biopsie) ou dans un fluide biologique (bilan sanguin). Ils sont associés aux différents composés tels que les enzymes, les lipides, les sucres, les protéines et l'eau. La variation de leur concentration, leur structure et leur fonction peut être le signe de troubles physiopathologiques et associée à la façon dont l'organisme y réagit.

Comprendre et évaluer la signature des biomarqueurs peut être utile pour déterminer la présence, la localisation et la probabilité d'une déficience. Ainsi, les biomarqueurs peuvent aider à une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques : ils peuvent être utilisés comme outils de diagnostic et de prédiction pour certaines pathologies, comme la maladie parodontale mais aussi permettre de développer des cibles thérapeutiques potentielles.

Notre travail de thèse est axé sur l'identification de marqueurs moléculaires et organisationnels de la muqueuse buccale humaine et de son biofluide : la salive. En effet, l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de la muqueuse buccale au cours du vieillissement physiopathologique peut être à l'origine de modifications détectables sur sa réponse vibrationnelle, thermique, ou mécanique. La composition salivaire est modifiée tout au long de la vie mais aussi dans certaines conditions générales (insuffisance rénale, déshydratation, diabète, iatrogénie médicamenteuse...) et locales (édentement, état bucco-dentaire dégradé), ce qui pourrait se traduire par une évolution de sa réponse vibrationnelle.

Il est également envisageable d'extraire différents marqueurs vibrationnels de la salive, qui pourraient être utilisables comme biomarqueurs de la santé générale et de pathologies spécifiques.

Nous présentons dans cette partie un résumé des études de caractérisation menées sur des échantillons muqueux ainsi que sur d'autres tissus dermiques.

I.F.1. Analyses vibrationnelles

La spectrométrie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF) et la spectrométrie Raman permettent d'étudier la composition moléculaire d'échantillons biologiques complexes. La spectrométrie IR repose sur l'absorption d'un rayonnement électromagnétique alors que la spectrométrie Raman est basée sur la diffusion inélastique du rayonnement électromagnétique. Les spectroscopies Infrarouge et Raman couplées à la microscopie sont particulièrement adaptées à la cartographie chimique. Ces méthodes permettent d'accéder à des données spatiales et moléculaires pour caractériser un tissu complexe avec ou sans préparation des coupes [83], [84]. Dans le cadre d'analyses physiopathologiques des tissus, l'analyse statistique multivariée des données est souvent nécessaire afin de pouvoir mettre en évidence les différences spectrales.

Une large base de données spectrales a été établie par analyse IRTF des cellules [85], [86], des fluides biologiques [87], des tissus biologiques [88], [89], des protéines [90], des lipides [91], des glucides et des acides aminés [92]. La spectrométrie IRTF apporte des informations sur le degré d'hydratation, la proportion des composants et parfois la nature des structures secondaires des protéines constitutives de l'échantillon.

La région la plus couramment explorée pour la signature spectrale d'échantillons biologiques en IRTF est comprise entre 4000 et 400 cm^{-1} (Figure 17).

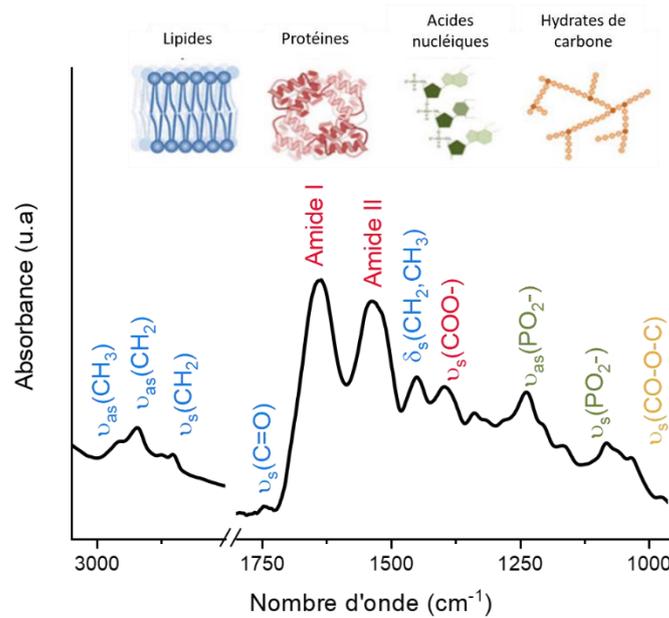


Figure 17: Spectre infrarouge typique d'un échantillon biologique de derme humain [2]

Ainsi l'indexation des différentes bandes d'absorption du derme abdominal a pu être effectuée à partir de nombreuses données bibliographiques associées à l'étude des collagènes et de la MEC dermique [2].

Les techniques de spectrométrie sont aussi éprouvées pour caractériser les tissus buccaux [91], [93]–[95]. On peut citer l'étude spectrométrique IRTF et Raman de Schwarz et *al* [95] visant à comparer la muqueuse buccale, vaginale et la peau des oreilles de porc.

La cartographie biochimique associée à la spectroscopie Infrarouge a aussi permis de révéler une plus forte teneur en protéines totales au sein de la couche épithéliale de la muqueuse buccale par rapport à la couche *lamina propria*. Parmi les protéines des *épithélia* on retrouve principalement les protéines membranaires des cellules constitutives de cette couche. A travers la caractérisation vibrationnelle de tissus complexes, la technique IRTF a prouvé son efficacité pour discriminer ces couches constitutives [96].

Il est aussi à noter la variation de marqueurs spectraux (quantitatifs et qualitatifs) associés à des changements moléculaires chez des patients atteints de cancer et/ou d'inflammations locales [97]–[100]. Par exemple, une étude menée sur la carcinogénèse orale du hamster met en évidence la diminution drastique d'une bande d'absorption associée aux lipides dans les tissus tumoraux. La quasi-disparition de cette bande, pouvant être associée à la quantité relative de phospholipides, semble induite par le dysfonctionnement de la membrane cellulaire dans les tumeurs malignes qui entraîne une augmentation de la dégradation des lipides [97]. Quant à l'inflammation de type hyperplasie fibreuse, elle entraîne l'augmentation des bandes d'absorption associées à l'ADN [101] reliée à une augmentation des fibroblastes et à la présence de cellules inflammatoires.

La spectrométrie Raman, également utilisée dans le domaine biomédical et la microbiologie [102], donne des informations complémentaires sur le plan de la composition, de la structure moléculaire et des interactions moléculaire d'une cellule ou d'un tissu biologique [103].

Selon Mian et *al* [104], la technique Raman a permis de discriminer les tissus normaux et pathologiques, notamment au niveau de la couche épithéliale de modèles tissulaires buccaux. Singh et *al* [105] ont également utilisé cette méthode sur des tissus buccaux humains afin de détecter des lésions pré-malignes sur des sites normaux ou cancéreux. Les analyses vibrationnelles ont permis de suivre l'atrophie des tissus et la fibrose radio-induite au niveau de la muqueuse buccale lors d'irradiation thérapeutique [89]: des anomalies structurales et biochimiques de l'*épithélium* buccal soumis à de fortes expositions aux radiations pendant le traitement de patients atteints de cancer de la tête et du cou sont mis en évidence, avec par exemple l'élargissement des amides I, II et III pour les échantillons irradiés ou encore la diminution des bandes d'absorption associées aux liaisons phosphodiester et phosphate.

Si les techniques vibrationnelles se révèlent adaptées à l'analyse des tissus, la caractérisation des fluides biologiques (tels que la salive) est aussi prometteuse afin de quantifier les composants biochimiques [106]–[108]. L'analyse IRTF des fluides corporels (tels que l'urine, le sérum sanguin ou encore la salive) et la possibilité d'utiliser ces fluides comme miroir de l'état de santé d'un individu sont relativement récentes. En effet, des biomarqueurs vibrationnels salivaires posséderaient un fort potentiel de diagnostic, en particulier pour le stress physiologique [109] et le diabète [110], [111].

En odontologie, de fortes concentrations en esters, lipides et hydrates de carbone au sein de la salive ont été observées chez les patients atteints de caries [112]. Le tabac représente également un facteur de risque extrinsèque de pathologies inflammatoires buccales. Grâce à la caractérisation par IRTF, des teneurs plus faibles en phospholipides, acides aminés et acides lactiques ont été relevées chez des patients fumeurs atteints de parodontite chronique, par rapport aux patients non-fumeurs sans pathologies parodontales [113].

La salive et l'état buccal de la muqueuse sont cliniquement indissociables. En effet, pour un patient donné, leur caractérisation simultanée peut être révélatrice d'un état buccal sain ou pathologique. Compte-tenu de l'émergence de la technique IRTF pour caractériser la salive et du faible nombre de données disponibles dans la littérature, il apparaît intéressant d'effectuer un suivi des biomarqueurs salivaires vis-à-vis des données cliniques locales couplées aux données cliniques générales des patients.

I.F.2. Analyses mécaniques

De nombreuses techniques de caractérisation sont dédiées à la mesure des propriétés mécaniques des tissus biologiques. Pour la peau, les techniques les plus utilisées sont les tests de traction, de torsion, de succion et d'indentation. De nombreux essais ont mis en évidence le caractère complexe des propriétés mécaniques induites par la structure multi-échelle des tissus [114].

Afin de prédire, de façon précise, les contraintes des tissus buccaux soumis aux stress mécaniques, la mise en place d'essais non-invasifs est intéressante dans diverses situations en odontologie.

Les modifications des propriétés mécaniques sont également révélatrices de pathologies. Krouskop et *al* ont par exemple pu mettre en lumière une rigidification des tissus tumoraux sous compression [115].

Au sein de la cavité buccale, la muqueuse buccale et notamment la muqueuse masticatoire, est un tissu mou fortement soumis à des contraintes mécaniques. Durant la mastication alimentaire, les pressions de contact entre les mâchoires maxillaires et mandibulaires varient entre 8 et 50 MPa [116]. Le port de prothèse dentaire a manifestement une influence sur la réduction de l'épaisseur de l'*épithélium* buccal ainsi que du raccourcissement des crêtes épithéliales [78]. La muqueuse devient donc plus vulnérable à la pression. La *lamina propria* étant richement vascularisée, le liquide interstitiel apporte indirectement un rôle amortisseur [117]. En effet avec écoulement du flux sanguin, les fibres de collagène vont s'orienter suivant la contrainte. Chez les patients âgés et avec charge occlusale, il a été observé une nette diminution de ce flux, induisant une fragilisation des tissus de soutien.

Le comportement mécanique de la muqueuse, matériau hétérogène, résulte à la fois d'une composante solide (comprenant la couche épithéliale, le réseau fibreux et les vaisseaux sanguins) et d'une composante liquide (l'eau et le sang). Basés sur les travaux de Kydd et Daly [118], des essais de fluage en compression (Figure 18) ont été réalisés sur de la muqueuse buccale porcine hydratée [119], mettant en évidence le caractère viscoélastique des tissus cutanéomuqueux.

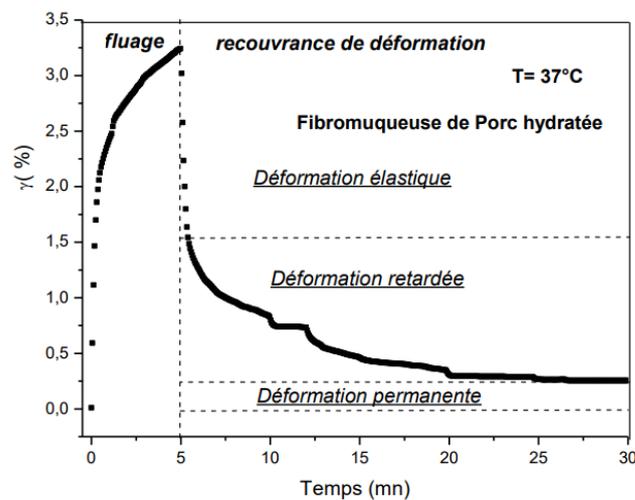


Figure 18: Essai de fluage d'échantillons de fibromuqueuse de porc hydraté [6]

Peu d'analyses ont été effectuées sur la relation entre l'architecture et les propriétés mécaniques des tissus buccaux ; la connaissance de ces propriétés s'avère cependant indispensable pour évaluer l'effet du vieillissement ou de l'inflammation et en vue de développer de nouveaux matériaux prothétiques.

De récentes analyses MEB ont révélé la distribution unidirectionnelle des fibres de collagène, à savoir perpendiculaire à la charge, au sein de tissus gingivaux. Au sein des tissus palatins et alvéolaires, la distribution des fibres étant plus aléatoire, le système est plus fragile sous une charge masticatoire [120].

Les fibres de collagène au sein de la *lamina propria* et la nature kératinisée de l'*épithélium* permettent au tissu mou de résister aux déformations [121], [122], [123]. En effet, il a été démontré que la gencive kératinisée (gencive attachée) possède une rigidité plus élevée (avec un module de Young d'environ 20 MPa) que la gencive non-kératinisée (gencive non-attachée) qui présente un Module d'Young d'environ 5 MPa [124], [125].

Des analyses en compression dynamique, réalisées sur des échantillons de muqueuse buccale porcine [119] ont montré la dépendance du module E' (quantifiant la rigidité) avec l'hydratation des tissus. En effet, il a été noté une augmentation d'un facteur 10 du module E' avec la déshydratation.

I.F.3. Analyses thermiques

Si la caractérisation thermique de la muqueuse buccale n'est pas décrite dans la littérature, de nombreux auteurs se sont intéressés au comportement thermodynamique de tissus mous tels que le derme [126], les tendons et ligaments, [127], [128], les tissus cardiovasculaires [129], la cornée [130] et de leurs protéines principales ; ces études ont montré l'intérêt de l'analyse thermique pour répondre à des problématiques associées à la santé.

Parmi les techniques de caractérisation thermique, l'analyse calorimétrique diatherme (ACD) est la plus utilisée pour déterminer et la nature des transitions thermiques associées à ces tissus complexes. Le couplage avec l'Analyse thermogravimétrique (ATG) permet d'accéder à la stabilité thermique des tissus et à leur hydratation.

Dans le cadre des travaux réalisés au sein de l'équipe du Phypol, la technique d'analyse calorimétrique diatherme a permis d'évaluer l'organisation hydrique du derme humain [131] en fonction de l'exposition au soleil de patients de deux groupes d'âges. Il a été observé une profonde modification de l'organisation hydrique avec le vieillissement extrinsèque, avec en particulier une augmentation de la quantité d'eau totale et cristallisable au détriment de la quantité d'eau liée.

C'est en particulier le suivi des transitions spécifiques des protéines constitutives de la matrice extracellulaire (transition vitreuse de l'élastine et dénaturation des collagènes) qui permet de détecter les variations structurales de la MEC induites lors du vieillissement, de la pathologie ou d'un traitement biochimique ou physique particulier [128], [132]–[134].

Largement décrit dans la littérature, le collagène est sensible à la chaleur, provoquant l'effondrement de la triple hélice qui entraîne alors la dénaturation du collagène en gélatine. Les analyses thermiques permettent ainsi d'évaluer la stabilité thermique du collagène sous différentes formes (gels [135], tissus [126], fibrilles [136] ou solution [137]) et à différents degrés d'hydratation.

Miles *et al.* ont mis en évidence la sensibilité du réseau de collagène au degré d'hydratation des tissus. En effet, pour des échantillons très faiblement hydratés, il a été observé un décalage de l'endotherme de dénaturation vers les hautes températures. L'eau en excès entraîne un gonflement du réseau protéique et ainsi assure une liberté de mouvement plus importante entraînant une grande instabilité thermique [138], [139].

Le suivi de la dénaturation thermique du collagène de peau de rats a mis en évidence la présence d'au moins trois niveaux de réticulation proportionnellement liés à la stabilité du réseau collagénique en fonction de l'âge [140]. Willett et *al.* ont confirmé, par des analyses ACD de tendon bovin, que la surcharge mécanique en traction entraîne une diminution des températures de dénaturation et donc une modification de la stabilité thermique du collagène. Ils ont conclu que le mécanisme de déformation augmentait la liberté moléculaire des molécules de collagène, entraînant une réduction de la stabilité moléculaire thermique [141].

Au sein du derme humain, la chute significative de la stabilité thermique du collagène, au travers la mesure de température de dénaturation, s'explique de par la déstabilisation et/ou la fragmentation des fibres de collagène avec l'âge et l'exposition cumulative aux UVs tout au long de la vie [131]. En revanche, un gain de stabilité thermique du collagène de la peau, induit par le phénomène de glycation, a été observé chez des patients atteints de diabète [142]. Des analyses calorimétriques diathermes réalisées sur des tissus cicatriciels humains ont permis d'identifier une augmentation de l'enthalpie de dénaturation du collagène, provoquée par une production accrue de collagène par rapport aux tissus normaux [132].

I.F.4. Analyses diélectriques

Les tissus biologiques, riches en eau et en protéines, constituent un milieu hétérogène multicouche présentant des permittivités diélectriques différentes suivant la gamme de fréquence étudiée. La présence de fibres au sein des tissus suppose la présence de cavités et de vides, autant de sites discrets qui permettent à l'eau de se confiner dans le système biologique. Les mesures d'impédance sont ainsi utilisées pour la caractérisation des tissus biologiques à tout niveau (moléculaire, subcellulaire ou cellulaire). Une attention particulière a été portée à l'analyse du degré d'hydratation des tissus dermiques et muqueux grâce aux mesures diélectriques.

Les analyses de cornéométrie qui utilisent la mesure de permittivité diélectrique des couches superficielles des tissus cutanéomuqueux ont montré que le taux d'hydratation de la muqueuse buccale chez les patients âgés de plus de 40 ans est inférieur à celui des 20-30 ans. Alanen et *al.* ont démontré l'importance de la teneur en humidité de la couche externe de la peau (*stratum corneum*) sur les propriétés diélectriques [143].

Les mesures diélectriques à haute fréquence ont permis de déterminer les permittivités diélectriques de chacune des couches constitutives de la peau [144]. Yamamoto et *al.* [145] ont observé qu'il y avait de fortes disparités diélectriques entre les différentes couches d'un tissu complexe, une dispersion en dessous de 10 kHz a été relevée et semble significative d'une faible conductivité de la couche externe de la peau. Martinsen et *al.* [146] ont étudié le comportement diélectrique du *stratum corneum* de la peau. Par des mesures d'admittance, ils ont déterminé que la valeur de la conductance de la couche kératinisée de la peau contribue de manière significative à la conductance globale de la peau. Une étude plus récente a affirmé que la relation entre le volume occupé par les couches constitutives de l'échantillon et sa contribution diélectrique est non linéaire [147].

Au niveau des tissus buccaux humains, une étude par impédancemétrie a mis en évidence des différences significatives de l'impédance suivant la localisation et l'état pathologique de la muqueuse. En effet, un épithélium structuré tel que l'épithélium pavimenteux stratifié oral possède des impédances supérieures aux basses fréquences, car l'épithélium est constitué de cellules étroitement liées. En présence de dysplasies sévères ou modérées, qui perturbent l'architecture épithéliale normale et la stratification, une diminution d'impédance a été relevée pour ce type de lésions [148]. Les mesures d'impédances réalisées sur différents tissus mous de la cavité buccale montrent qu'il existe des différences en termes de valeurs de permittivité et de conductivité. Ces différences proviennent notamment de la conductivité du liquide extracellulaire et des cellules contenues au sein des échantillons [149].

Les données diélectriques basse fréquence issus du travail de la thèse de R. Tang sur le derme humain révèlent l'influence du photo-vieillissement sur des indicateurs liés à la dynamique de l'eau libre au sein des tissus dermiques hydratés. A l'échelle de la dynamique délocalisée (à l'échelle du nanomètre), il a été observé une diminution significative de la fraction collagénique avec l'effet cumulé du vieillissement chronologique et le photo-vieillissement [150].

II. Matériaux et méthodes

II.A Echantillons

Dans ce chapitre sont présentés les protocoles d'extraction et de préparation des différents échantillons analysés ainsi que les techniques de caractérisations utilisées pour extraire la distribution des marqueurs biophysiques.

II.A.1. Echantillons prélevés dans le cadre de l'étude préliminaire

Des échantillons de muqueuse buccale sont extraits à partir des maxillaires et mandibules de trois porcs âgés de 6 à 8 mois. Les lambeaux muco-périostés frais (Figure 19) sont prélevés sur toute l'épaisseur de la gencive linguale ou vestibulaire attachée [119]. Ces lambeaux sont transportés au laboratoire à 4 °C, puis rincés à l'eau pure. Afin d'éliminer l'excès d'eau, les lambeaux sont déposés sur du papier absorbant puis stockés à -20 °C, afin de préserver leur intégrité.

Une série de biopsies est prélevée sur le lambeau muco-périosté congelé à l'aide d'un punch à biopsie.

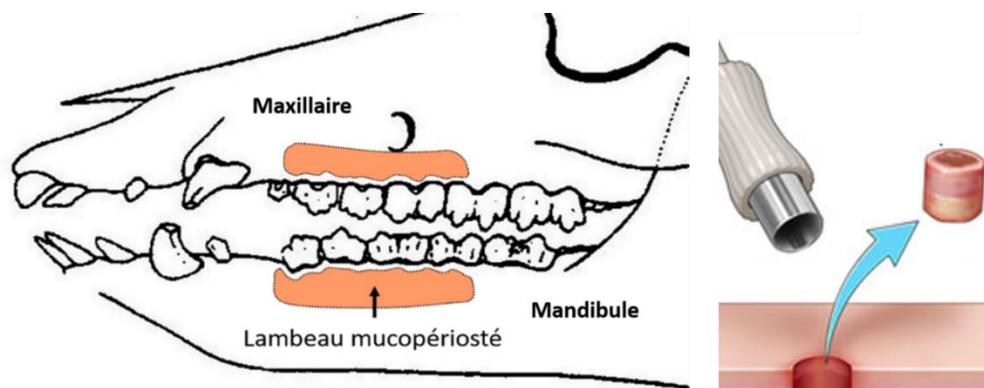


Figure 19: Localisation du prélèvement de la muqueuse buccale porcine

Des études ont démontré la fragilisation des échantillons biologiques après décongélation rapide [151], [152]. Nous avons donc opté pour une décongélation douce et progressive, en utilisant un protocole précédemment validé sur le derme humain [1]. Les biopsies à analyser à l'état hydraté sont décongelées au réfrigérateur pendant 10 minutes à 5 °C avant les mesures de caractérisation. En revanche, les biopsies à analyser à l'état déshydraté ne sont pas soumises à décongélation douce et sont directement placées congelées dans le lyophilisateur pendant 12h.

Les dimensions des échantillons sont adaptées selon des techniques de caractérisation. Des biopsies de 4 mm de diamètre sont prélevées pour les caractérisations thermiques et vibrationnelles. En revanche, des biopsies de 8 mm de diamètre sont prélevées pour les tests mécaniques.

II.A.2. Echantillons prélevés dans le cadre de l'étude clinique MMOBUCC

II.A.2.1 Effectifs

En accord avec l'Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche (USRM) et compte tenu du caractère exploratoire de l'étude, du caractère multiple des critères de jugement et de l'absence d'éléments de la littérature permettant d'orienter le calcul d'effectif, le nombre de sujets à inclure dans l'étude avait été fixé arbitrairement à 66 patients dont 33 âgés de 20 à 40 ans et 33 âgés de 70 à 90 ans de façon à effectuer une analyse d'au moins 30 individus par tranche d'âge. En vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux patients et selon le protocole MMOBUCC, les données recueillies sur les personnes sont rendues anonymes. Sur les cahiers d'observation (CRF) figure la première lettre du nom et du prénom du sujet, accompagnée d'un numéro codé propre à la recherche (01 pour les patients du groupe 1 [70-90 ans] et 02 pour les patients du groupe 2 [20-40 ans]), suivi de l'ordre d'inclusion des sujets. Par exemple, le patient n°08 du groupe 1 [70-90ans] se verra attribuer le code 01-08.

II.A.2.2 Critères d'inclusion et de non inclusion

Les patients éligibles à l'étude clinique sont ceux qui nécessitent un acte de chirurgie classique (extraction, pose d'implant...) au CHU de Toulouse. Les prélèvements de muqueuses buccales sont donc réalisés au moment de l'acte chirurgical après signature d'un consentement libre (signature effectuée au plus tard le jour de l'inclusion et avant tout examen nécessité par la recherche). Les patients doivent également rentrer dans l'une des deux tranches d'âges considérées.

Les patients non éligibles à l'étude sont les suivants :

- Patient porteur de sondes de gastrostomie,
- Patient en cure de chimiothérapie,
- Patient en soins palliatifs (ou ayant une espérance de vie inférieure à 30 jours),
- Patient avec contre-indication chirurgicale,
- Patient à haut risque d'endocardite infectieuse,
- Patient sous sauvegarde de justice.

II.A.2.3 Suivi des patients, extraction des échantillons et relevé de données générales et cliniques

Lors de la visite d'inclusion, l'investigateur/praticien prend soin de vérifier les critères d'éligibilité.

A l'issue de cette visite, toutes les informations recueillies sont inscrites dans un cahier d'observation CRF (Case Report Form) à partir du dossier médical et de l'observation clinique de chaque patient.

L'âge, le sexe, les données cliniques générales (indice de Charlson, traitements en cours) sont renseignées. Lors de l'examen complet de la bouche, les indices OHAT (Oral Health Assessment Tool), OHI (Oral Health Index) et SBI (Sulcus Bleeding Index) sont relevés et rendront compte des données cliniques locales du patient.

Avant l'acte chirurgical du prélèvement de la biopsie de muqueuse, un prélèvement salivaire est effectué sur le patient. Lorsque le prélèvement est possible, 1 ml de salive par patient est collecté puis transvasé dans un tube sec.

Comme la diminution du flux salivaire chez les personnes âgées s'accompagne souvent d'une sécheresse accrue de la muqueuse, il peut arriver que le prélèvement salivaire ne puisse pas être effectué (en cas de sécheresse buccale par exemple). Cela est rapporté sur le cahier d'observation CRF et n'annule pas les prélèvements et les essais sur la muqueuse. En effet, l'hyposialie est fréquente chez le sujet âgé et le flux salivaire et l'état muqueux sont cliniquement corrélés [81]. Le « non » prélèvement constitue une donnée à confronter avec les marqueurs associés à la muqueuse.

Les prélèvements salivaires sont transportés dans les mêmes conditions que ceux des muqueuses à +4°C. Sur le site, ils sont directement centrifugés pendant 30 minutes à 6500 tours/min à 20°C puis placés au congélateur à -20°C le jour de la visite d'inclusion jusqu'au surlendemain. Durant la centrifugation, les déchets solides s'accumulent au fond du tube à sec. Seule la phase aqueuse est analysée après une décongélation douce au réfrigérateur.

La Figure 20 présente les différents sites de prélèvements au niveau du maxillaire et de la mandibule. Les prélèvements sont effectués au niveau du maxillaire et de la mandibule, côté vestibulaire ou lingual, ou sur la crête édentée en l'absence de dents.

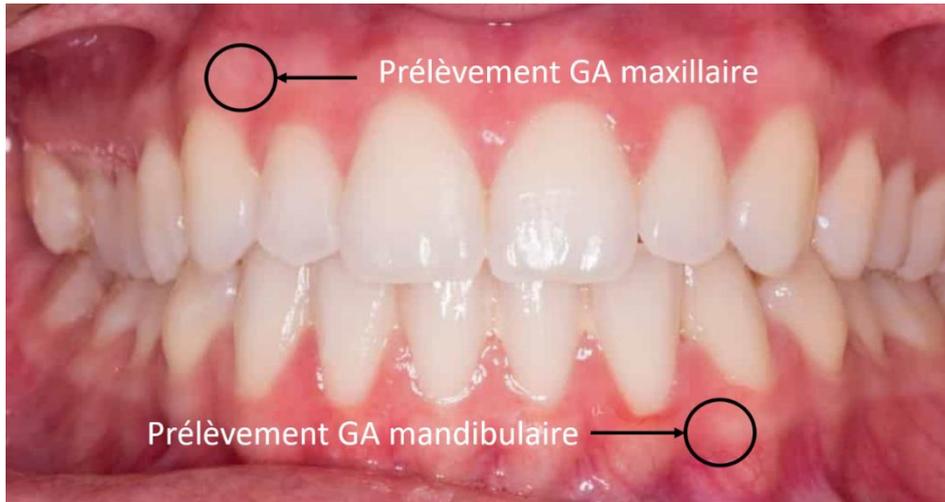


Figure 20 : Sites de prélèvement de gencive attachée (GA) au sein de la cavité buccale humaine

Les prélèvements de muqueuse buccale se limitent à une biopsie par patient et sont effectués à l'aide d'un décolleur et d'une lame type bistouri et/ou un punch à biopsie dans un lambeau muco-périosté de pleine épaisseur de gencive attachée. Le site du prélèvement jouxte le site chirurgical.

Une fois les biopsies prélevées, celles-ci sont transportées au laboratoire à 4°C. Sur site, les biopsies sont rincées au sérum physiologique, puis déposées sur du papier absorbant. Les biopsies sont ensuite conservées au congélateur à -20°C le jour du prélèvement jusqu'au lendemain matin. Avant toute analyse, l'échantillon est placé 10 minutes au réfrigérateur à 5°C pour une décongélation douce.

Le tableau présenté en Annexe 3 récapitule les analyses réalisées sur les échantillons muqueux et salivaires. En raison du contexte sanitaire lié à la pandémie de SARS-Covid-19, 38 patients au lieu des 66 initialement prévus ont fait l'objet de cette étude clinique.

II.A.2.4 Gestion de stockage et d'analyse des échantillons

Durant la congélation des échantillons biologiques, l'eau inter et extracellulaire se solidifie entraînant la formation de cristaux plus ou moins importants. Ces cristaux entraînent des effets néfastes sur la membrane cellulaire, provoquant donc des explosions de cellules ou une déshydratation durant les cycles successifs de congélation-décongélation [153]. Il a également été démontré que les basses températures de congélation et leur durée favorisent l'augmentation de la mort cellulaire [154].

Afin de préserver l'hydratation des échantillons de muqueuse buccale, il convient de les stocker le moins longtemps possible au congélateur. Pour limiter les variabilités et dans la mesure du possible, la durée de congélation est identique pour chaque échantillon.

II.A.3. Feuillets dermiques

II.A.3.1 Elaboration des feuillets dermiques

L'équipe IDeAs (Dr. L.Gibot et S. Gouarderes) du laboratoire des IMRCP (Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique) propose une méthode originale d'ingénierie tissulaire : l'élaboration de feuillets dermiques par auto-assemblage (Figure 21). Cette technique repose sur la capacité des fibroblastes dermiques à produire leur propre matrice extracellulaire, lorsqu'ils sont cultivés en présence d'acide ascorbique [155], [156].

Les fibroblastes dermiques humains sont isolés enzymatiquement à partir d'une biopsie de prépuce après une posthécotomie. Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture DMEM contenant 4,5 g/l de glucose, de la L-glutamine, du pyruvate, des antibiotiques pénicilline et streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur. Celles-ci sont maintenues à 37°C, une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

Une fois les fibroblastes isolés, 50 µl d'acide ascorbique est ajouté dans le milieu de culture, afin de favoriser la production, la sécrétion et la maturation du collagène.

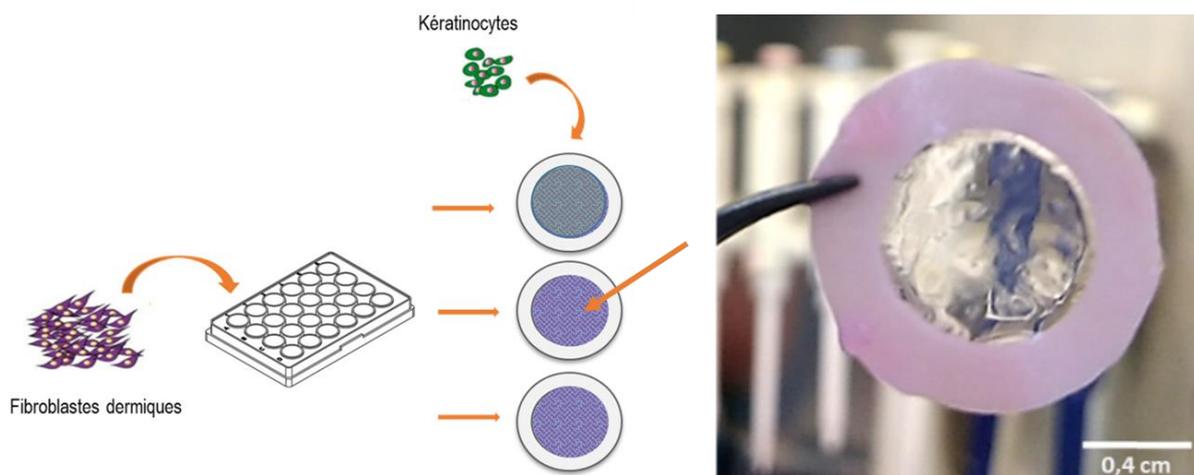


Figure 21: Approche d'auto-assemblage à l'élaboration de feuillets dermiques avec ancrage en papier [168]

Cultivés en monocouches pendant 3 semaines, les fibroblastes sécrètent suffisamment de matrice extracellulaire afin d'obtenir des feuillets dermiques de 50 µm d'épaisseur. Les feuillets sont cultivés sur une plaque de plusieurs puits (Figure 21).

II.A.3.2 Traitement des feuillets par électroporation

L'électroporation est le phénomène transitoire de formation des pores ou de perméabilisation de la membrane cellulaire lorsque celle-ci est soumise à un champ électrique. Parmi les techniques d'électroporation utilisées en médecine, on retrouve l'électrochimiothérapie (ECT, nommé Short Pulse protocole (SP) dans nos expérimentations) et l'électrotransfert de gènes (GET pour gene electrotransfer, nommé long pulse protocole (LP) dans nos expérimentations).

Reconnue dans le domaine clinique, la première méthode consiste à combiner la pénétration de molécules anti-tumorales avec application locale de plusieurs impulsions électriques courtes sur le site de la tumeur. Ce traitement est ainsi moins invasif, clairement plus ciblé et limite très fortement les effets secondaires induits par la prise de traitements médicamenteux [157].

La seconde méthode consiste à appliquer des impulsions électriques de l'ordre de la milliseconde pour assurer la migration électrophorétique des acides nucléiques et faciliter leur pénétration dans les cellules électropéabilisées. Elle est notamment utilisée dans le cadre de manipulations géniques suivies de l'analyse des effets phénotypiques.

Utilisés en principe en tant qu'agent de vectorisation de molécules thérapeutiques, ces deux protocoles d'électroporation sont appliqués aux feuillets dermiques précédemment décrits, sans l'ajout d'aucun principe actif.

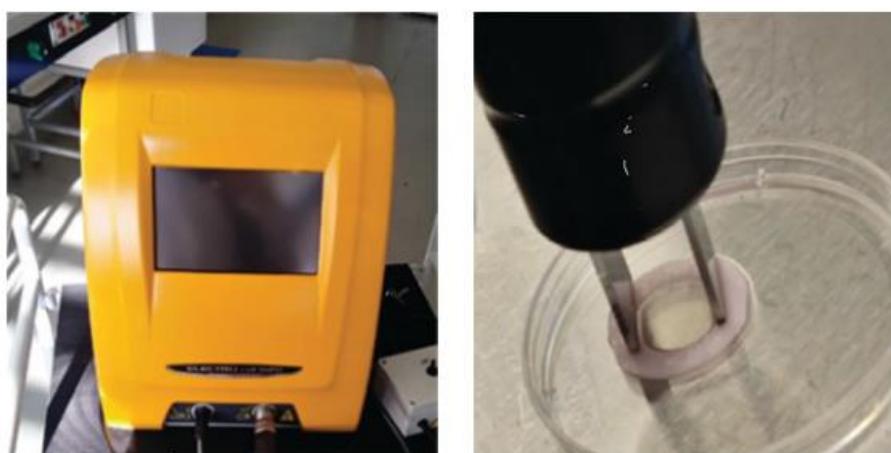


Figure 22: Electropulseur et électrodes stimulant l'ensemble du feuillet dermique

La Figure 22 présente le dispositif utilisé afin de mettre en place une électropéabilisation transitoire et réversible des fibroblastes dans un feuillet dermique. Une fois le feuillet dermique cultivé, celui-ci est délicatement placé sur une lamelle en verre, puis deux électrodes parallèles, plates et inoxydables, espacées de 1 cm sont positionnées sur le support en papier du feuillet. Un champ électrique est délivré à température ambiante par l'électropulseur, suivant les protocoles SP et LP (Tableau 7).

Tableau 7: Protocoles d'électroporation appliqués aux feuillets dermiques

Protocoles d'électroporation	Impulsions courtes (SP) classiquement utilisées en électrochimiothérapie	Impulsions longues (LP) classiquement utilisées en électrotransfert de gène
Nombre d'impulsions	8	10
Durée de l'impulsion	100 μ s	5 ms
Fréquence	1 Hz	1 Hz
Champ électrique	<800 V/cm	<300 V/cm

Les échantillons seront dénommés comme suit :

- CTRL : feuillets dermiques en condition contrôle, n'ayant pas reçu de traitement
- LP 24h et LP 48h : feuillets dermiques analysés 24h et 48h après électroporation LP
- SP 24h et SP 48h : feuillets dermiques analysés 24h et 48h après électroporation SP

II.A.4. Explants de peau de souris

Une collaboration a été initiée avec l'équipe PPB (Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux) du CIRIMAT, qui développe des stratégies thérapeutiques innovantes pour la cicatrisation de plaies chroniques. Dans cette optique l'équipe (Dr. S.Girod-Fullana et M. Farno) travaille sur des modèles de souris génétiquement modifiées, en raison de leur disponibilité et leur facilité de manipulation.

Les modèles murins (souris db/db) sont obtenus par mutation génétique de la leptine.

Dans le cadre de nos travaux et du suivi de l'évolution des biomarqueurs avec le diabète de type II, les explants de peaux de souris diabétiques db/db sont comparés aux explants de peaux de souris issus de la souche sauvage (WT ; Wild Type C57BL/6).

Des biopsies de 10 mm de diamètre d'explants de peaux hydratés sont réalisées au niveau du dos de l'animal. Une fois prélevées, celles-ci sont congelées à -80°C, transportées à -4°C puis stockés à -20°C. Avant toute analyse, l'échantillon est placé 10 minutes au réfrigérateur à 5°C pour une décongélation douce.

Les analyses vibrationnelles des explants sont réalisées uniquement sur la partie derme tandis que les analyses thermiques et mécaniques sont effectuées sur l'ensemble du tissu.

II.B Méthodes

Dans cette partie sont présentées les différentes techniques de caractérisations utilisées pour extraire la distribution des marqueurs biophysiques sur les différents échantillons.

II.B.1. Spectroscopie Infrarouge en réflexion totale atténuée (IRTF-ATR)

- Principe

Cette technique largement utilisée dans le domaine de la physico-chimie doit son intérêt à la rapidité d'acquisition (grâce à la transformée de Fourier de l'interferogramme), à son caractère non destructif et la possibilité d'étudier des échantillons sous différents états. Avec une préparation préalable minimale des échantillons, cette technique est ainsi de plus en plus utilisée pour collecter un ensemble de données spectrales sur un nombre important d'échantillons biologiques.

Le principe de la mesure est basé sur l'excitation des liaisons chimiques par l'intermédiaire d'un rayonnement infrarouge. Cette excitation génère des modes de vibrations (élongation, déformation comme la torsion) dont les fréquences de résonance sont généralement situées dans le domaine infrarouge.

Le spectre d'absorption du rayonnement infrarouge par l'échantillon permet donc de détecter les vibrations caractéristiques des groupements chimiques de différente nature et permet dans certains cas de déterminer la concentration des espèces en présence.

Le mode réflexion totale atténuée (Attenuated Total Reflectance, ATR) est le plus utilisé pour les échantillons biologiques. Dans ce cas, le faisceau infrarouge subit de multiples réflexions à l'interface cristal-échantillon et le rayonnement pénètre légèrement dans le milieu. Ce rayonnement est appelé onde évanescente. La profondeur de pénétration du rayonnement infrarouge dépend de l'indice de réfraction des deux milieux en présence, de la longueur d'onde et de l'angle d'incidence (équation 1) :

$$dp = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2\theta - n_2^2}} \quad (1)$$

Avec : λ la longueur d'onde de la radiation incidente, θ l'angle d'incidence et n indice de réfraction du milieu.

- Dispositif expérimental

Les spectres IRTF-ATR sont réalisés en utilisant un Nicolet 5700 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, MA) équipé d'un accessoire ATR (Smart Orbit avec un cristal de diamant de type IIA, indice de réfraction 2,4) avec un séparateur de faisceau KBr et un détecteur MCT/B. L'acquisition et le traitement des spectres sont réalisés à l'aide du logiciel Omnic 8.3 THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, MA).

Le spectre de l'air ou de l'échantillon est obtenu par transformée de Fourier de l'interférogramme enregistré dans le domaine temporel. Pour l'ensemble des échantillons étudiés une accumulation de 32 spectres d'absorbance est réalisée dans la gamme 4000 à 400 cm^{-1} avec une résolution entre bandes voisines de 2 cm^{-1} .

- Mise en place du dispositif pour des échantillons à l'état hydraté

Les échantillons à l'état hydraté (muqueuse buccale porcine, muqueuse buccale humaine, explants de peaux de souris) sont déposés sur le dispositif ATR et recouverts d'une capsule hermétique avec un anneau en "O" pour éviter la déshydratation de l'échantillon pendant l'acquisition des spectres (Figure 23).

Dans le cas des muqueuses buccales porcines et humaines, et afin d'obtenir les spectres de chacune des couches constitutives (*lamina propria* et d'*épithélium*), les deux faces de la biopsie sont successivement placées sur le cristal.

Cette même procédure est appliquée pour analyse IRTF des explants de peaux de souris, face derme uniquement dans ce cas.

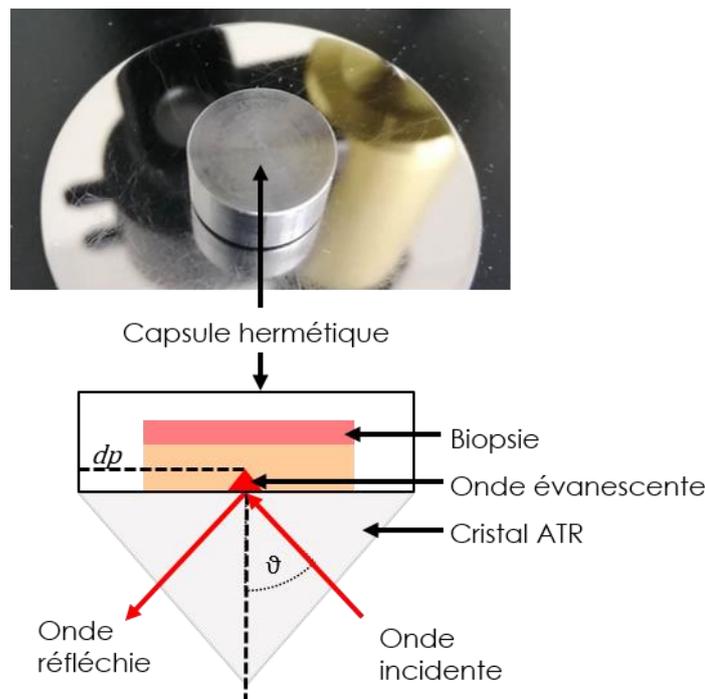


Figure 23: Mise en place d'un échantillon hydraté sur le dispositif IRTF-ATR

Avec un angle d'incidence ϑ de 45° , une longueur d'onde comprise entre 4000 et 400 cm^{-1} et en considérant que l'indice de réfraction d'échantillons biologiques hydratés est $n_2 \sim 1,33$, la profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans les échantillons (équation 1) est alors estimée entre 0,4 et 3,6 μm .

- Mise en place du dispositif pour des échantillons déshydratés ou lyophilisés

Pour les échantillons muqueux porcins lyophilisés et afin d'assurer le contact entre le matériau déposé sur le dispositif et le cristal, une légère pression est appliquée aux échantillons à l'aide d'une pointe en PTFE.

Pour la collecte des données vibrationnelles des échantillons de salive, 1 μ L de phase aqueuse de salive, préalablement centrifugée et décongelée, est déposé sur le dispositif ATR à l'aide d'une micropipette (Figure 24). Afin de s'affranchir de la réponse prédominante de l'eau en matière de réponse spectrale, l'échantillon aqueux est séché durant 20 minutes afin d'obtenir un film de salive déshydratée.

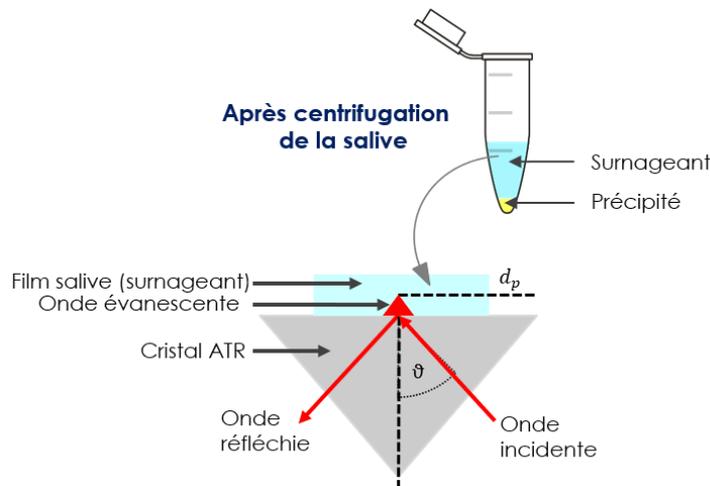


Figure 24: Mise en place d'un échantillon salivaire sur le dispositif IRTF-ATR

Quant aux feuillets dermiques (Figure 25), ils sont déposés sur le dispositif ATR et déshydratés pendant 20 minutes à température ambiante avant l'acquisition spectrale. La face inférieure et la face supérieure sont successivement placées sur le cristal pour acquérir le spectre de chaque face.

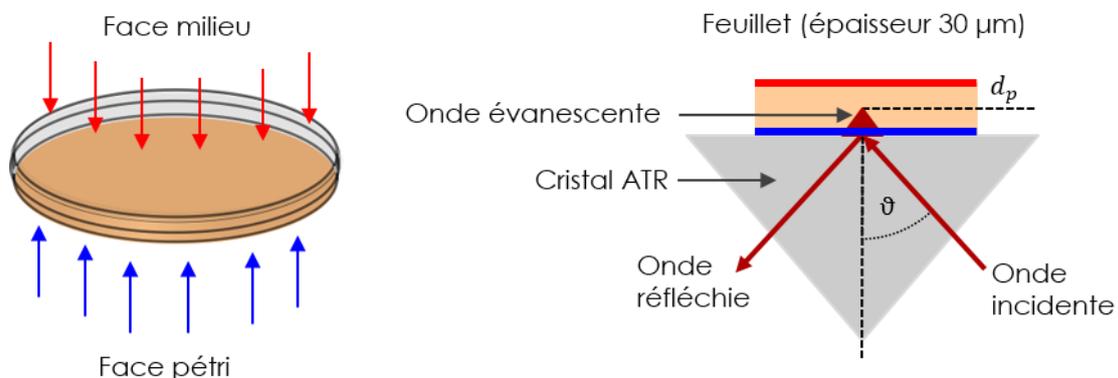


Figure 25: Analyses des feuillets dermiques par IRTF-ATR

- Traitement des spectres

Le spectre de l'air, enregistré toutes les heures est soustrait du spectre de l'échantillon. Ensuite, les spectres sont corrigés de la ligne de base, lissés (11 points Savitzky Golay) et normalisés à l'amide II [1540-1550 cm^{-1}] ou à la bande de déformation des C-H [1487-1428 cm^{-1}] par la méthode de normalisation Min-Max : Pour tous les spectres la valeur d'absorbance maximale du spectre dans la région spectrale sélectionnée est égale à un, la valeur d'absorbance minimale vaut 0.

Dans le but d'améliorer la résolution initiale et en particulier pour séparer les bandes d'absorption très rapprochées, les spectres de dérivée seconde sont calculés. Ils sont obtenus par la procédure de Savitsky-Golay en fixant l'ordre polynomial à 2 et le lissage à 13 points.

Afin de confirmer la position des bandes d'absorption, révélées par les minimas sur les dérivées secondes des spectres, la méthode d'auto-déconvolution (FSD) est utilisée. Pour extraire des données complémentaires vis-à-vis de la réponse vibrationnelle des muqueuses buccales, des traitements de sur-résolution ont été appliqués en définissant les paramètres « largeur de bande » et « Amélioration ». La sur-résolution permet une réduction de la largeur des bandes d'absorption tout en garantissant leur fréquence et intensité. Pour cela la « largeur de la bande » a été fixée à 12 et l'« amélioration » à 2,5 dans la zone Amide I/II.

II.B.2. Analyse Thermo Gravimétrique (ATG)

- Principe

Le principe de l'analyse thermogravimétrique est de mesurer la variation de masse d'un échantillon sous atmosphère contrôlée lors d'un programme en température (rampe de température ou palier). Un couplage avec une cellule de mesure IRTF peut être effectué pour identifier les effluents produits lors des phénomènes de désorption de solvants, de déshydratation et de décomposition des échantillons.

- Dispositif expérimental

Les mesures ATG sont réalisées avec un analyseur thermogravimétrique Q50 (TA Instrument, New Castle, DE). Afin de s'affranchir des phénomènes d'oxydation des échantillons biologiques, les expériences sont réalisées sous flux d'azote.

Le dispositif (Figure 26) se compose d'une enceinte servant à contrôler l'atmosphère, d'un four, d'un circuit de refroidissement à eau, d'une microbalance et d'un thermocouple. Dans une coupelle en alumine, l'échantillon à analyser est placé sur une nacelle accrochée à la suspente.

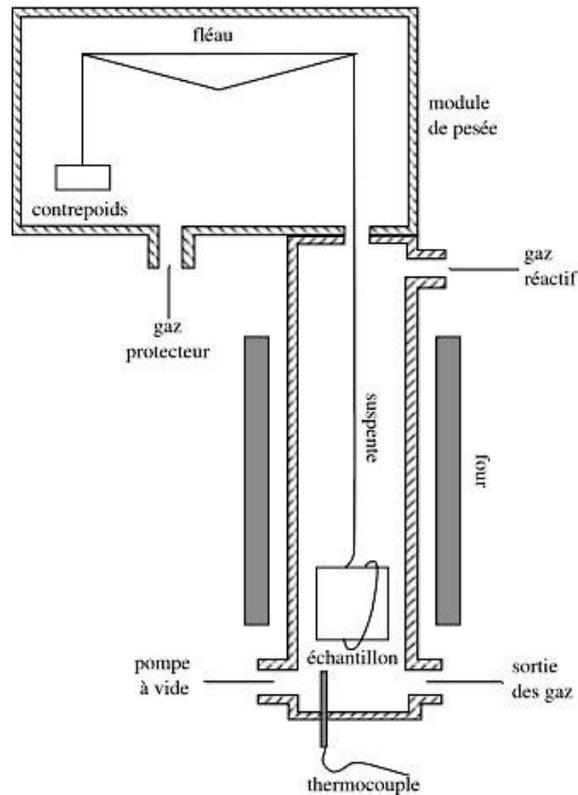


Figure 26: Schéma du dispositif ATG

- Thermogrammes ATG

Le thermogramme ATG présenté à titre d'exemple sur la Figure 27 met en évidence la perte de masse (en %) en fonction de la température ; il est ainsi possible de déterminer les différentes étapes de perte de masse en fonction de la température et d'évaluer les pourcentages relatifs aux différents constituants des échantillons.

Les courbes dérivées premières en fonction de la température (DTG), ici en valeur absolue, sont souvent complémentaires afin de mieux définir, via les maxima, les différentes étapes de perte de masse lors des processus multi-étapes.

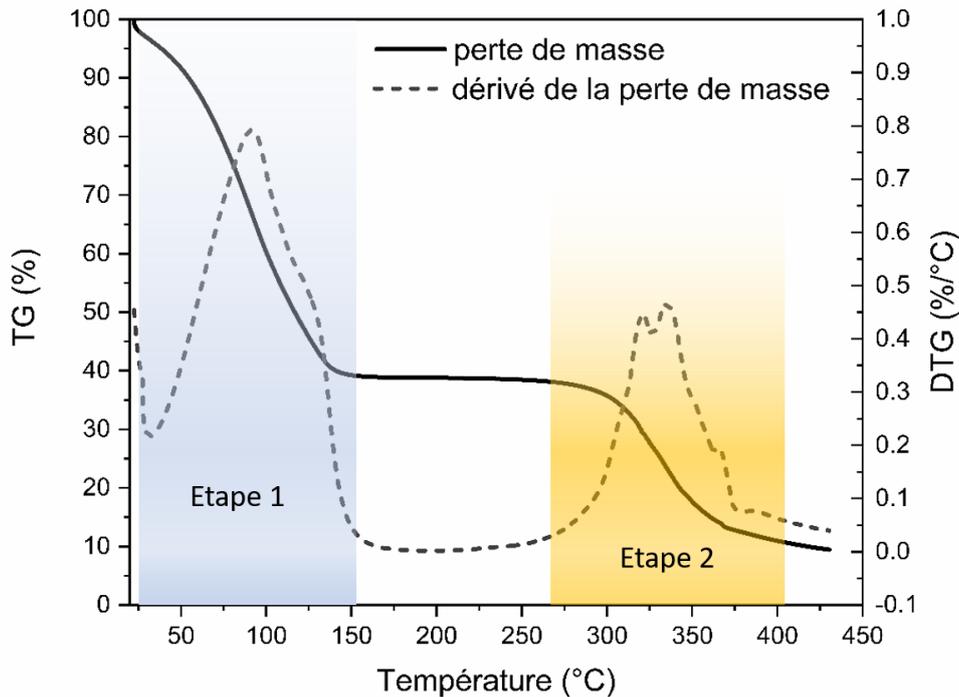


Figure 27: Thermogramme TGA (TG) et thermogramme dérivée (DTG) d'échantillons de ligament bovin en fonction de la température [169]

La première étape de perte de masse, située entre 25 et 200°C, correspond à la déshydratation de l'échantillon biologique. La seconde perte de masse, entre 250 et 400°C, est liée à la dégradation de l'échantillon du tissu biologique (Figure 27).

Cette technique étant destructive et consommatrice en termes d'échantillons, elle est uniquement utilisée pour l'étude de tissus porcins.

II.B.3. Analyse Calorimétrique Diatherme (ACD)

- Principe

L'ACD est une technique très largement utilisée pour déterminer les transitions thermiques de matériaux ; elle a été adaptée à l'étude de protéines pures puis de tissus biologiques plus complexes [131], [158]. Contrairement à la technique Infrarouge-ATR, qui permet une exploration sur une faible profondeur (de l'ordre du micron) et comme l'ATG, cette analyse thermique correspond à la réponse de l'ensemble de l'échantillon.

L'ACD consiste à placer une coupelle de référence et une coupelle contenant l'échantillon dans deux fours distincts. Pourvus de résistances chauffantes individuelles ainsi que de sondes en température, ces deux fours sont chauffés simultanément. Par compensation de puissance, le dispositif mesure directement et de manière continue la différence de puissance électrique dW à fournir à la référence et à l'échantillon de façon à annuler la différence de température entre les coupelles selon un programme en température bien défini, avec :

$$dW = W_{\text{échantillon}} - W_{\text{référence}} = q m \left(\frac{dH}{dT} \right)_p \quad (2)$$

Où la puissance dW , normalisée à la masse m de l'échantillon, q la vitesse de montée en température et $(dH/dT)_p$ la différentielle de l'enthalpie par rapport à la température à pression constante. Cette différence de puissance enregistrée en fonction de la température constitue le thermogramme ACD.

- Dispositif expérimental

Les mesures ACD sur les différents échantillons sont effectuées avec un calorimètre DSC Pyris (PERKIN ELMER, Waltham, MA). L'appareil est calibré en température et en constante de cellule en utilisant comme standard l'indium (phénomène de fusion). Les sensibilités obtenues en température et en flux de chaleur sont respectivement égales à $0,1^\circ\text{C}$ et $0,5 \text{ mW}$.

L'échantillon est placé dans une coupelle hermétique pour les échantillons biologiques à l'état hydraté (Figure 28). Ce type de coupelle permet de garantir l'hydratation de l'échantillon durant le programme en température. Pour chaque échantillon, la coupelle hermétique vide sert de référence.

Pour les échantillons à l'état déshydraté, des coupelles non hermétiques sont utilisées.

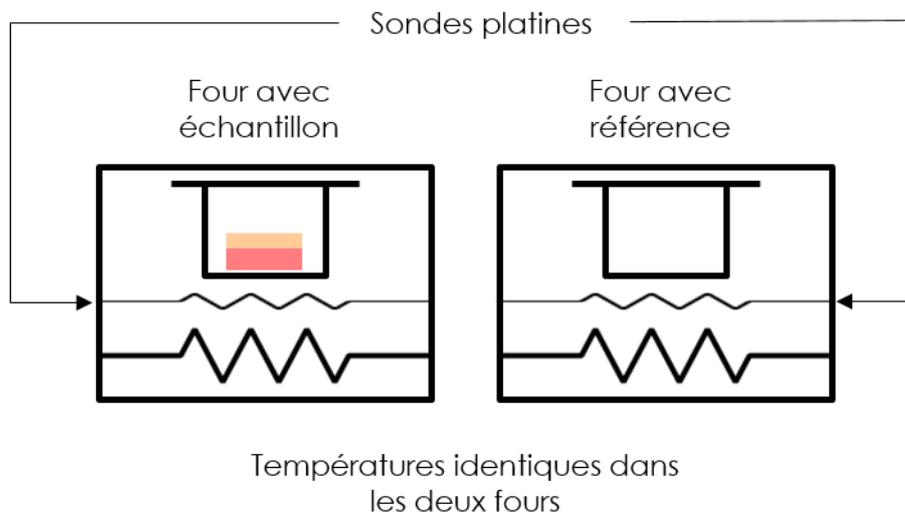


Figure 28: Schéma du dispositif Pyris Diamond Perkin Elmer

- Thermogrammes ACD

Pour les échantillons biologiques, deux types de transitions sont généralement décrites :

- Les transitions du premier ordre, caractérisées par des pics endothermiques ou exothermiques. A titre d'exemple nous avons reporté, le thermogramme ACD correspondant à la première rampe en température d'un échantillon de ligament bovin hydraté (Figure 29). Nous pouvons observer deux transitions du premier ordre. La première centrée sur 0°C est relative à la fusion de l'eau cristallisable. La

seconde transition, observée entre 60 et 80°C, est caractéristique de la dénaturation du collagène.

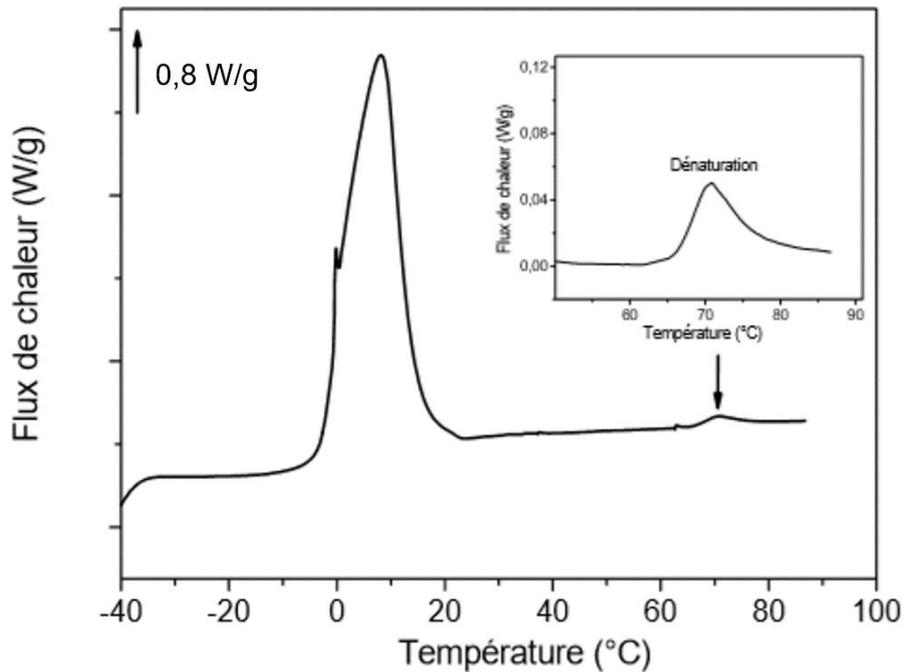


Figure 29: Thermogramme ACD d'un échantillon de ligament bovin à l'état hydraté [169]

- Les transitions du pseudo-second ordre telles que la transition vitreuse, facilement identifiables par un saut de capacité calorifique ΔC_p . La Figure 30 met évidence par exemple le saut de chaleur spécifique, entre 180 et 220°C, associé à la transition vitreuse de l'élastine sur des échantillons de ligaments bovin déshydratés. La transition vitreuse est un phénomène réversible observé lors de rampes de température successives.

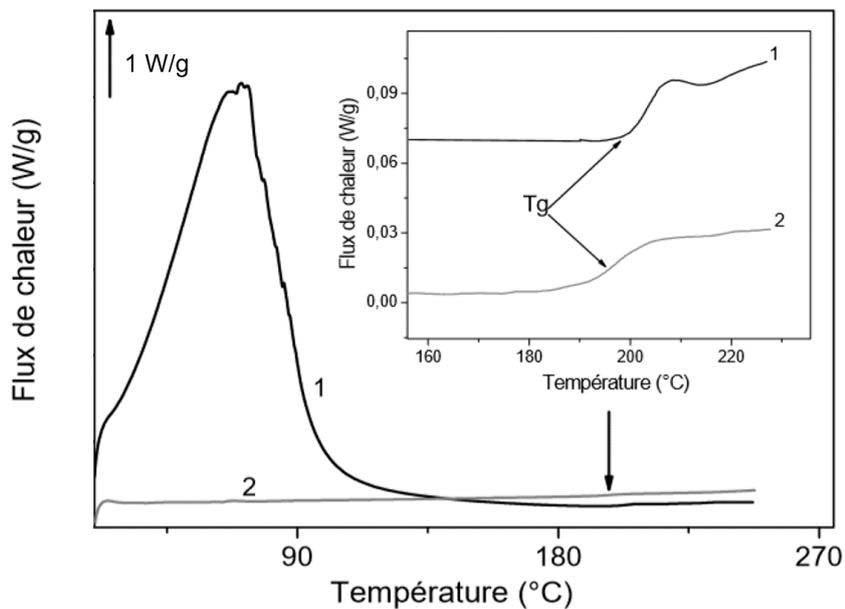


Figure 30: Thermogramme ACD d'un échantillon de ligament bovin à l'état déshydraté [169]

Cette technique permet aussi de révéler des phénomènes thermiques irréversibles telles que des réactions de décomposition de nature endothermique ou exothermique.

II.B.4. Analyse mécanique dynamique (AMD)

La rhéologie de cisaillement est une technique expérimentale reconnue pour caractériser les matériaux viscoélastiques d'un point de vue mécanique.

○ Principe

L'Analyse Mécanique Dynamique permet de déterminer le comportement viscoélastique d'un matériau dans la gamme des phénomènes linéaires par des tests oscillatoires de faible amplitude (Figure 31). En pratique, cela consiste à appliquer à un échantillon une contrainte sinusoïdale (en traction, compression, flexion ou cisaillement) de faible amplitude et de pulsation ω donnée à température fixe de la forme :

$$\sigma(\omega) = \sigma_0 \sin(\omega t) \quad (4)$$

où σ_0 est l'amplitude

et à mesurer la déformation sinusoïdale associée (Figure 31), de la forme :

$$\gamma(\omega) = \gamma_0 \sin(\omega t - \delta) \quad (5)$$

où γ_0 est l'amplitude et δ le déphasage ou angle de perte lié à la dissipation d'énergie lors de la déformation.

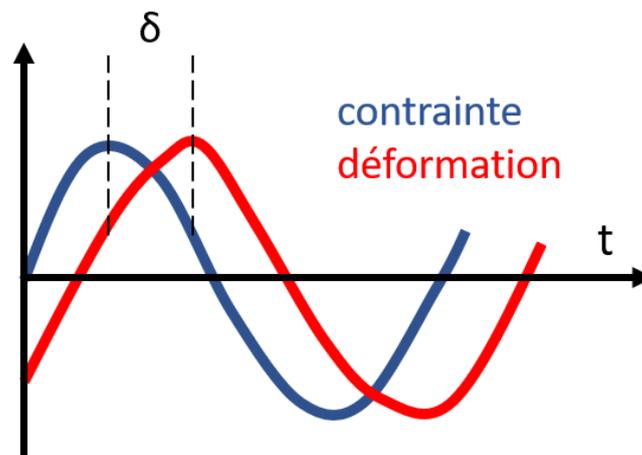


Figure 31: Réponse d'un matériau viscoélastique une sollicitation périodique

Afin de répondre à une problématique de physique vibratoire, il convient d'associer chaque grandeur réelle à une grandeur complexe de même fréquence de sollicitation.

Dans ce formalisme complexe, en cisaillement, la contrainte et la déformation complexe s'écrivent :

$$\sigma^*(\omega) = \sigma_0 e^{j\omega t} \quad (6)$$

Et

$$\gamma^*(\omega) = \gamma_0 e^{j(\omega t - \delta)} \quad (7)$$

La contrainte σ^* et la déformation γ^* précédemment décrites sont reliées par le module dynamique complexe de cisaillement G^* tel que :

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma^*(\omega)}{\gamma^*(\omega)} = G'(\omega) + j G''(\omega) \quad (8)$$

Comme décrit dans l'équation 8, ce module complexe est composé d'une composante réelle G' et une composante imaginaire G'' .

La partie réelle correspond au module de « conservation » ou « élastique » caractéristique du comportement élastique du matériau. La partie imaginaire, également appelé « module de perte », est caractéristique de sa composante visqueuse. La réponse en déformation sera déphasée de δ par rapport à la contrainte appliquée (Figure 31).

L'équation 9 présente le rapport entre le module de perte et le module de conservation, plus connu sous le nom de $\tan(\delta)$ ou facteur de perte.

$$\tan(\delta) = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \quad (9)$$

Ce facteur est représentatif du caractère visqueux/élastique du matériau suivant des conditions expérimentales données. Pour un matériau purement élastique $\tan(\delta) = 0$ et pour un matériau purement visqueux $\tan(\delta) \rightarrow +\infty$.

○ Dispositif expérimental et modes de mesures

Les tests sont effectués à l'aide du rhéomètre Discovery HR-2 de la gamme Discovery Hybrid Rheometer (DHR) commercialisée par Thermal Analysis Instruments (TA). Ce rhéomètre, à contrainte imposée, est équipé d'un dispositif à effet Peltier qui permet le contrôle de la température. Les tests en cisaillement dynamique sont effectués en géométrie plan-plan. Les plans, de diamètre variant entre 8 et 40 mm de diamètre, sont sablés sur-mesure afin d'améliorer l'adhérence entre les plateaux et l'échantillon durant les essais. La géométrie supérieure permet de solliciter le matériau en mode cisaillement dans une gamme de fréquences comprise entre 10^{-7} et 100 Hz.

Les conditions d'essais, la provenance et la nature des échantillons sont autant de facteurs influant sur les valeurs des modules. Dans le cadre de nos travaux, les échantillons prélevés sont tous analysés à l'état hydraté.

Afin de déterminer les caractéristiques viscoélastiques des tissus biologiques, il convient de travailler dans des conditions physiologiques (température, hydratation et fréquence de sollicitation). L'échantillon biologique à l'état hydraté est placé dans une cuve à immersion (Figure 32).

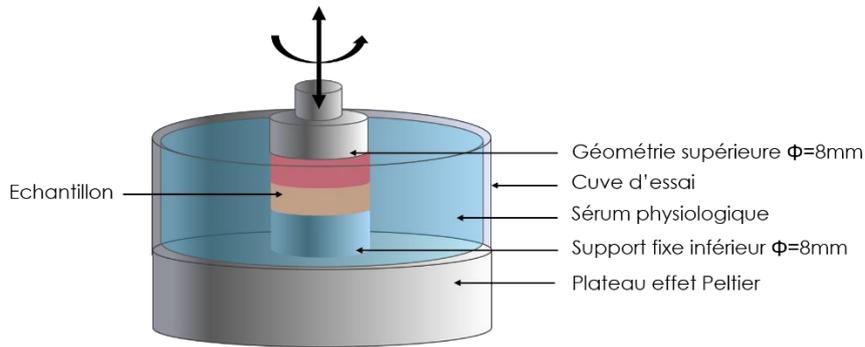


Figure 32: Schéma du rhéomètre Discovery HR-2

Pour les tests de balayage en déformation, la température de la cuve, remplie de sérum physiologique, est maintenue à 37°C par le module Peltier du rhéomètre.

Pour les balayages en température, les échantillons sont soumis à deux rampes en température successives de 37 à 85°C.

○ Balayage en déformation - domaine de linéarité

Avant toute mesure, il est nécessaire de déterminer la zone de déformation linéaire du matériau étudié. C'est la gamme de déformation pour laquelle contrainte et déformation sont linéairement liées. Cet essai s'effectue en faisant varier l'amplitude de la déformation à une température constante et à une fréquence donnée. Au-delà de la déformation critique, le comportement est non linéaire ; cela se traduit par la diminution des modules de conservation et de perte en fonction de la déformation. Cette amplitude limite peut dépendre de la fréquence et de la température, et cette détermination de la zone de linéarité doit donc être reconduite pour chaque fréquence de sollicitation et température étudiée par la suite.

La Figure 33 met en évidence à titre d'exemple le domaine de linéarité dans lequel le matériau répond de manière réversible et reste stable. Expérimentalement, la limite de linéarité est généralement déterminée comme l'amplitude de déformation correspondant à une chute de 5% du plateau du module G' .

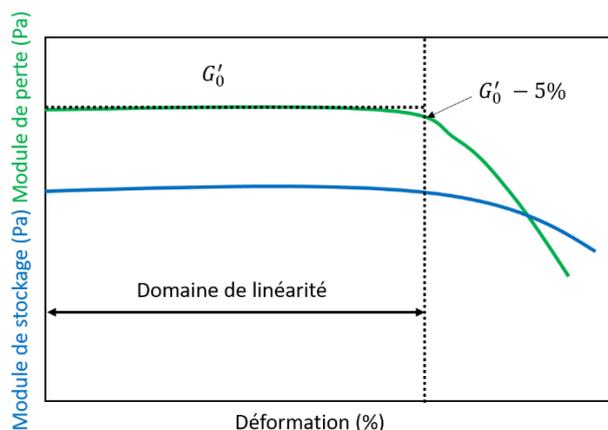


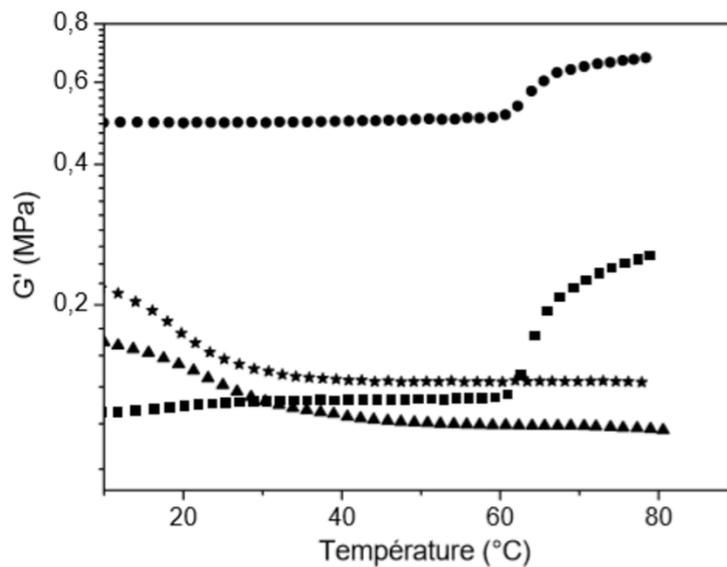
Figure 33: Evolution du module élastique et du module de perte en cisaillement du Polyisobutylène en fonction de la déformation

- Balayage en fréquence

Une fois le domaine de linéarité déterminé, il est possible d'effectuer un balayage en fréquence. Il s'agit ici de solliciter l'échantillon à déformation constante et température constante en faisant varier la fréquence de sollicitation dans une gamme qui reproduise les conditions physiologiques (fréquence de sollicitation, température) du tissu biologique.

- Balayage en température

Lors d'un balayage en température, l'évolution des modules viscoélastiques est suivie en fonction de la température, à déformation constante et fréquence constante, en utilisant une vitesse de chauffage constante ou par paliers isothermes. L'exemple illustré sur la Figure 34 présente l'évolution du module élastique d'échantillons de ligaments bovins soumis à une rampe successive en température de 10 à 80°C à fréquence et déformation constante.



(Ligament natif : ■, Ligament délipidé : ●, Ligament autoclavé : ▲ et Ligament traité à la soude : ★)

Figure 34: Evolution du module de cisaillement G' de ligaments bovins en fonction de la température pour une pulsation de 1 rad/s et une déformation de 1% [169]

Sur le ligament natif et le ligament autoclavé, on observe une brusque variation du module élastique à partir de 60°C.

- Validation de la géométrie plan-plan de 8 mm de diamètre

Pour l'analyse mécanique dynamique des polymères, les tests oscillatoires de faible amplitude sont usuellement réalisés avec des géométries plan/plan de 40 ou 20 mm de diamètre. Le diamètre de nos échantillons biologiques ayant été fixé à 8 mm de diamètre, il est nécessaire de travailler avec une géométrie de cette dimension, réalisée sur mesure, et qu'il convient de valider.

La Figure 35 présente l'évolution des modules de conservation G' d'échantillons élastomère de type Poly-diméthyl-siloxane (PDMS), à 25°C, pour une fréquence de 1Hz, lors d'un balayage en déformation dans le cas de 3 géométries plan-plan de diamètre différents.

Dans cette gamme de déformation [0.01 et 5%] qui correspond au domaine linéaire, nous notons une légère augmentation du module conservatif G' avec la diminution du diamètre de la géométrie. Il conviendra donc de comparer les modules G' à géométrie constante par la suite.

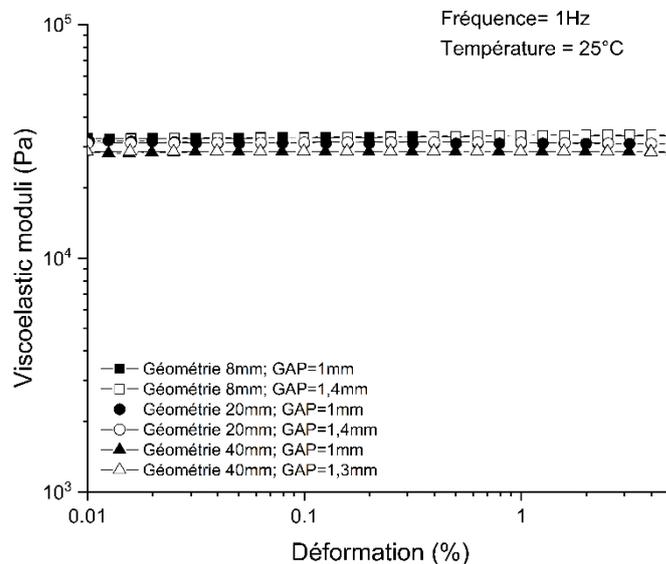


Figure 35: Evolution du module conservatif G' d'échantillons de PDMS entre 0.01 et 5% de déformation (à $f= 1\text{Hz}$ et à $T=25^\circ\text{C}$)

Il est également à noter la reproductibilité des essais pour différentes épaisseurs d'échantillons.

II.B.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques permettent de décrire par un nombre réduit de paramètres les observables issues d'un grand nombre d'échantillons. Elles permettent aussi d'établir des critères pour décider si les différences observées entre deux ou plusieurs observables issues de différentes populations sont significatives ou bien dues au hasard.

- Analyses univariées

Les variables aléatoires continues sont résumées sous forme de médiane et d'intervalle interquartiles ou de moyennes et d'écart-type à la moyenne. Les variables catégorielles ou qualitatives sont décrites en termes d'effectifs et de pourcentages.

Les valeurs extrêmes sont également données et les courbes de distribution sont tracées. Le test de Shapiro-Wilk est utilisé pour définir si la distribution s'écarte significativement de la normalité.

La comparaison entre moyennes issues de différents groupes est évaluée au moyen du test de Student ou de l'ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey sous réserve du respect des conditions d'application (normalité de distribution de la variable continue dans chaque modalité de la variable catégorielle et homogénéité des variances (test de Levene)). Dans le cas contraire, le test non paramétrique de Wilcoxon est utilisé. Ces tests permettent d'étudier le lien entre les variables catégorielles (localisation, traitement, classe d'âge, données cliniques générales et locales, etc...) et les variables quantitatives associées aux marqueurs vibrationnels, thermiques et mécaniques des différents échantillons étudiés dans cette thèse.

Dans le cas de la muqueuse buccale humaine et de la salive associée, certains indices associés aux données cliniques sont analysés tout d'abord en tant que variables catégorielles puis en tant que variable quantitative.

Le lien entre deux variables quantitatives est étudié par l'estimation du coefficient de corrélation de Spearman et de Pearson et de leur comparaison par rapport à 0.

Le lien entre deux variables catégorielles est analysé via le test exact de Fisher.

L'ensemble de l'analyse statistique descriptive et univariée est effectuée avec le logiciel R 3.4.3 (The R Project for Statistical Computing).

- Analyses multivariées

Les techniques statistiques univariées ne permettent que l'étude de la liaison entre deux variables : corrélation, régression et nuage de points par exemple ; au contraire, l'analyse statistique multivariée est de plus en plus utilisée pour traiter les données issues d'échantillons d'origine biologique afin de prendre en compte la globalité de l'information et des interactions entre variables [89], [94], [159].

L'analyse multivariée s'applique particulièrement à l'étude de spectres vibrationnels sur une collection d'échantillons biologiques, qui génèrent des tableaux (ou matrices) décrivant chaque individu (l'échantillon) par un grand nombre de données quantitatives (par exemple l'absorbance à chaque nombre d'onde) (Tableau 8).

Tableau 8: Exemple de tableau de données généré dans le cas de l'analyse IRTF d'échantillons biologiques

		p variables (nombre d'onde)					
		V1	V2	V3	V _i	...	V _p
n Individus (spectres)	Ech 1	Absorbance					
	Ech 2						
	Ech 3						
	Ech i						
	...						
	Ech n						

Afin d'obtenir l'information la plus pertinente possible et notamment en matière de variabilité entre individus, il faut envisager une transformation de la représentation des données. Les méthodes de projection, associées généralement à une réduction de l'information, procurent des alternatives visuellement acceptables.

Pour visualiser de manière perceptible le comportement des échantillons, il est nécessaire de concentrer l'information afin de la représenter dans un espace de 2 ou 3 dimensions. La concentration des données initiales est obtenue par la définition de nouveaux axes ou variables (composantes principales). Ces composantes principales sont des combinaisons linéaires des variables initiales déterminées en maximisant la variance des données projetée sur ces nouveaux axes. Mathématiquement, l'analyse en composantes principales est un changement de base qui permet de passer d'une représentation dans la base canonique des variables initiales à une représentation dans la base des facteurs définis par les vecteurs propres de la matrice des corrélations.

La première composante principale CP1 indique la direction de variance des données la plus élevée. Le deuxième axe, orthogonal à CP1 correspond à la direction de variance résiduelle non prise en compte par la composante précédente (Figure 36).

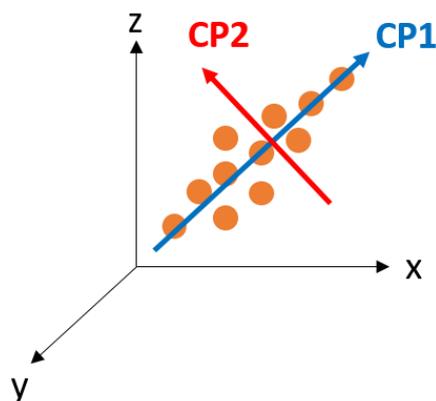


Figure 36: Définition de nouveaux axes d'études : les composantes principales

La majeure part de la variance est prise en compte par les premiers axes qui peuvent être représentatifs de la meilleure discrimination des individus.

Il est possible de représenter le pourcentage de la variance cumulée associée à chaque composante principale (CP) (Figure 37). La définition de la variance cumulée permet d'identifier le nombre de facteurs ou composantes principales à retenir pour la suite des analyses.

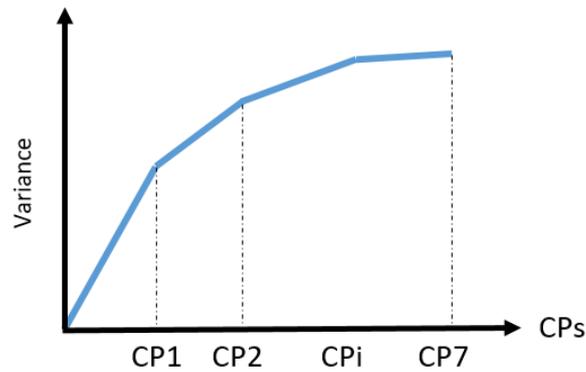


Figure 37: Représentation schématique du cumul de la variance en fonction des PC pour l'ensemble des échantillons

La méthode d'analyse en composantes principales pourra ainsi être utilisée pour identifier des similitudes et/ou différences entre groupes d'individus.

A titre d'exemple, la Figure 38 est issue d'une analyse ACP réalisée à partir de la signature vibrationnelle d'*épithélia* buccaux issus de deux groupes d'individus. Sur cette représentation, où chaque point représente un individu ou spectre, deux nuages de points sont clairement identifiés et correspondent aux deux groupes d'individus (sains et malades).

La discrimination des individus sains et malades suivant leur réponse vibrationnelle est ici confirmée selon l'axe PC1.

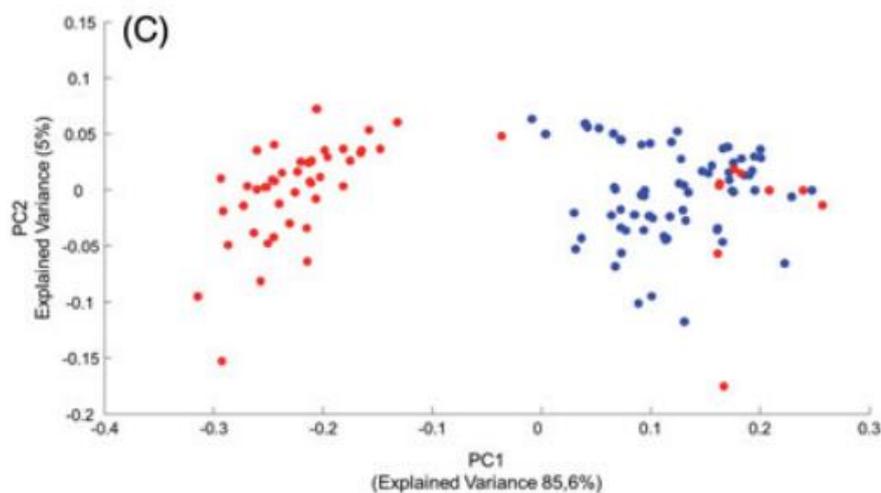


Figure 38: Projection des profils IR de deux groupes d'échantillons sur les 2 premières PC (ronds rouges ; patients atteints d'hyperplasie fibreuse inflammatoire et ronds bleus ; individus sains) [101]

Afin d'évaluer le poids de chacune des variables et leur interaction sur la réponse vibrationnelle, il est aussi possible de tracer chaque composante principale en fonction des variables de départ (nombre d'onde par exemple). Dans le cas de l'exemple précédent, il est ainsi intéressant de connaître la contribution de chaque nombre d'onde à la composante PC1, qui permet de discriminer les profils IR des *épithélia* sains et pathologiques (Figure 39).

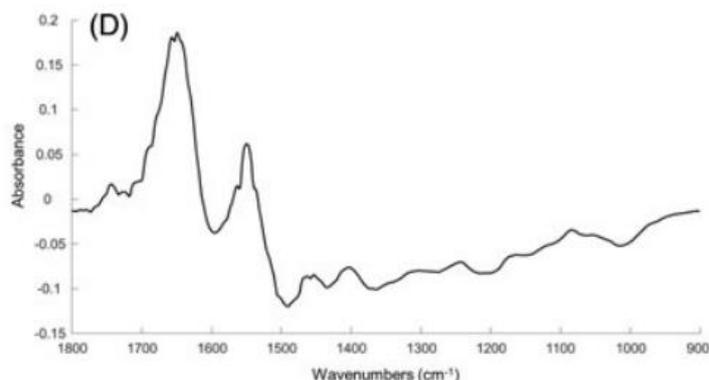


Figure 39: Contribution des variables (nombre d'onde) à la première composante principale PC1 [101]

Les contributions négatives observées dans la zone [1500-900 cm^{-1}] suggèrent une modification de la réponse spectrale au niveau des acides nucléiques et du glycogène chez les patients malades. De plus, les contributions positives entre 1800 et 1500 cm^{-1} , zone associée aux amides, démontrent une variation de la composante protéique.

Dans le cadre de notre travail de thèse, des analyses en composantes principales seront réalisées sur les spectres IR des différents types d'échantillons lorsque l'effectif sera suffisant.

La représentation graphique de chaque profil infra-rouge dans l'espace des composantes principales permettra une analyse exploratoire, non supervisée, des éventuels liens entre la réponse vibrationnelle des échantillons et les différentes variables catégorielles.

II.C Méthodes appliquées aux matériaux

Le Tableau 9 résume les techniques de caractérisation utilisées afin d'étudier le comportement physico-chimique des différents échantillons.

Tableau 9: Caractérisation biophysiques réalisées pour chaque type d'échantillons

	ATG	ACD	AMD	IRTF
Muqueuses buccales porcine	☒	☒	☒	☒
Muqueuse buccales humaine		☒	☒	☒
Salive humaine				☒
Explants de peaux de souris		☒	☒	☒
Feuillets dermiques		☒		☒

III. Mise en place et validation d'un protocole de caractérisation sur des modèles animaux

Ce chapitre est principalement consacré à la caractérisation biophysique d'explants buccaux porcins. La définition des biomarqueurs associés à ces tissus biologiques est complétée par la caractérisation d'explants de peaux issus de souris saines et pathologiques afin d'appréhender l'évolution des biomarqueurs associée à une pathologie spécifique.

III.A Caractérisation physico-chimique de la muqueuse buccale porcine et définition des biomarqueurs associés

III.A.1. Signature vibrationnelle des échantillons de muqueuse buccale

Il s'agit dans un premier temps de vérifier la capacité de l'IRTF pour :

- Obtenir des spectres de résolution suffisante et reproductibles à l'état hydraté,
- Extraire la signature vibrationnelle de chacune des couches constitutives de la muqueuse buccale : *épithélium* et *lamina propria*.

Il est enfin important de connaître l'influence de la localisation du prélèvement (maxillaire/mandibule) sur la réponse vibrationnelle.

Les premières analyses IRTF sur les échantillons à l'état hydraté et déshydraté ont mis en évidence une résolution acceptable des spectres et leur bonne reproductibilité.

La Figure 40 présente ainsi la réponse vibrationnelle (correspondant à la moyenne de 7 spectres issus d'échantillons différents, normalisés à l'amide II) de la *lamina propria* et de l'*épithélium* mandibulaire à l'état hydraté.

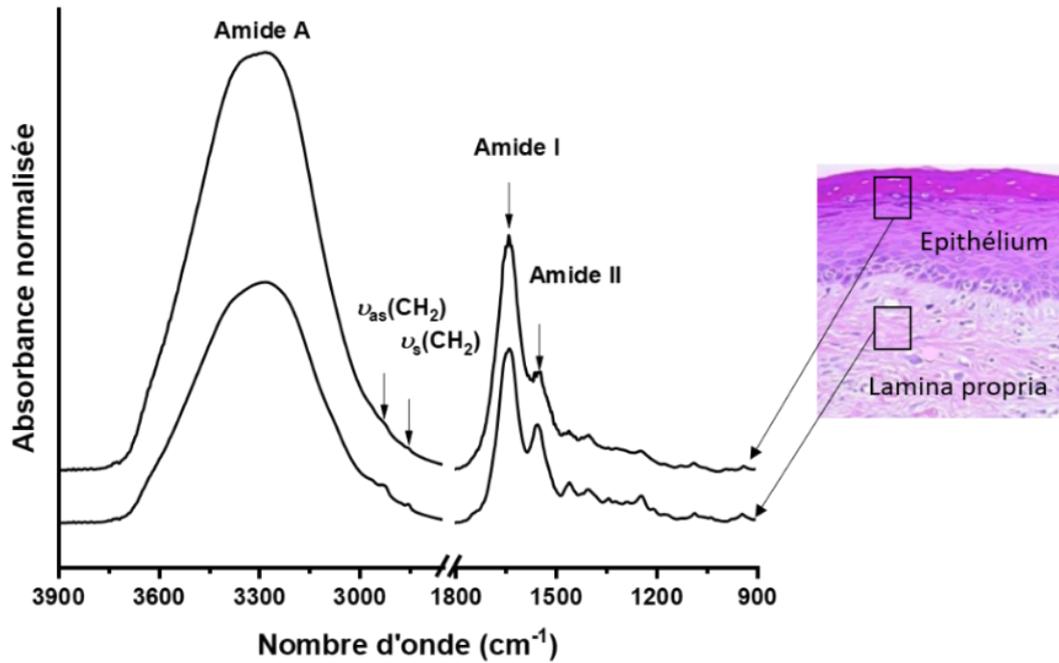


Figure 40: Spectres IR moyennés des couches épithélium et lamina propria de muqueuse mandibulaire hydratée dans la zone [3900-900 cm^{-1}]

La différence de composition des deux couches constitutives de la muqueuse buccale se traduit par des différences observables sur ces spectres moyens. Avant de procéder à des analyses plus fines de chacune des couches région par région et de procéder à l'indexation des différentes bandes, nous avons effectué l'analyse en composantes principales de l'ensemble de ces spectres (n=14) dans la zone [1460-900 cm^{-1}].

Nous pouvons observer sur la Figure 41 que les deux premières composantes principales permettent d'expliquer plus de 85% de la variance, ce qui traduit leur fort potentiel discriminant.

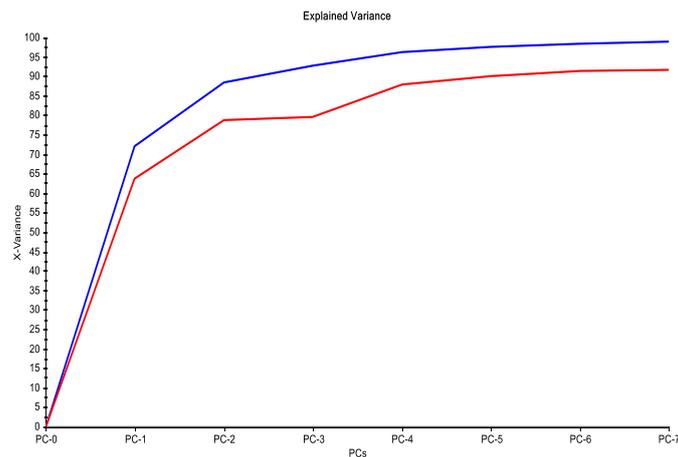


Figure 41: Variance cumulée en fonction des PC pour les échantillons de muqueuse ; épithélium et lamina propria

La Figure 42 présente la Projection des profils IRTF des spectres selon les deux premières composantes principales.

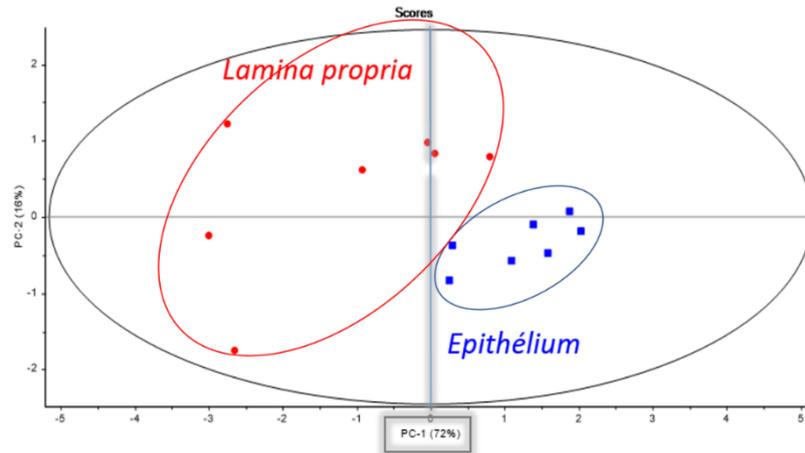


Figure 42: Projection des profils IRTF de la muqueuse buccale selon les 2 premières PC ; regroupement selon la couche étudiée

Nous notons une discrimination des deux couches selon la première composante principale (PC1), qui décrit 72 % de la variance. Cette analyse confirme la capacité de la méthode IRTF pour détecter des différences dans la signature spectrale des deux couches constitutives de la muqueuse buccale.

Nous reportons en Figure 43, la contribution des variables (les nombres d'ondes) à la première composante principale, discriminante pour la réponse vibrationnelle des couches constitutives. Ce tracé met en avant les régions spectrales ayant une forte contribution positive ou négative à la composante principale PC1.

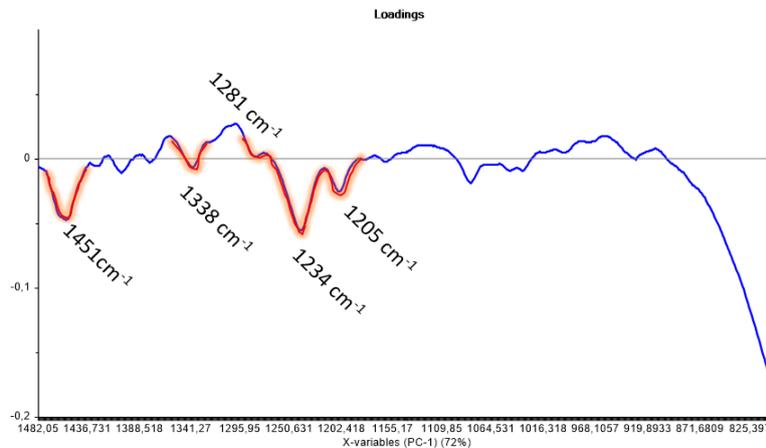


Figure 43: Contribution des variables (nombre d'onde) à la composante principale PC1 pour les échantillons de muqueuse ; épithélium et lamina propria

Nous mettons en évidence d'importantes contributions négatives pour certaines zones d'absorption à 1451, 1338, 1234 et 1205 cm^{-1} : cela signifie que ces absorptions particulières sont présentes dans les spectres de la lamina propria et peu ou pas détectables dans les spectres de l'épithélium.

III.A.1.1 Signature vibrationnelle de la lamina propria

- Indexation

La réponse vibrationnelle de la *lamina propria* hydratée de la muqueuse buccale est reportée sur la Figure 44 et la Figure 45 respectivement dans les zones $[3800-2550 \text{ cm}^{-1}]$ et $[1800-900 \text{ cm}^{-1}]$. Les réponses spectrales du derme et du collagène sont superposées à celle de la *lamina propria* afin d'effectuer une meilleure indexation des bandes qui sera proposée dans le Tableau 10.

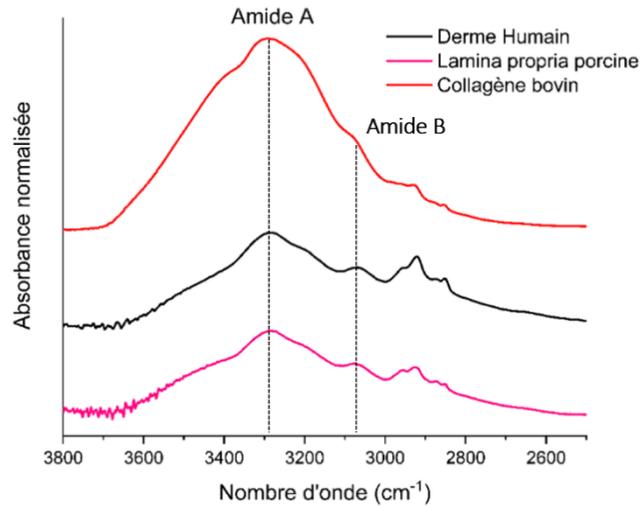


Figure 44: Spectre IRTF du derme humain, du collagène bovin et de la lamina propria porcine dans la zone $[3800-2500 \text{ cm}^{-1}]$

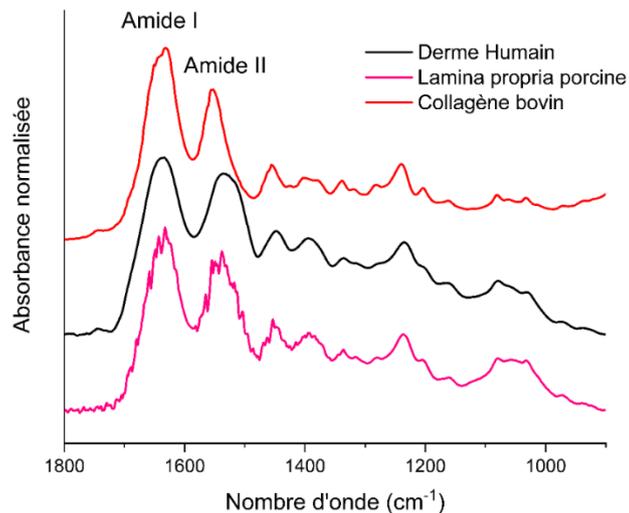


Figure 45: Spectre IRTF du derme humain, du collagène bovin et de la lamina propria porcine dans la zone $[1800-900 \text{ cm}^{-1}]$

La région spectrale $[3600-3000 \text{ cm}^{-1}]$ est principalement associée à l'amide A observée de façon générale pour les protéines.

Il est à noter que l'amide A est bien plus intense sur les muqueuses à l'état hydraté qu'à l'état déshydraté (cf comparaison des spectres des échantillons hydratés/déshydratés en Annexe 2 et en Annexe 3) et la bande amide B à 3080 cm^{-1} se superpose à celle de l'amide A (Figure 44). La bande 3080 cm^{-1} , bien marquée sur les spectres de la *lamina propria*, résulte principalement d'une résonance de Fermi de l'amide II.

Dans la plage [$3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$], sont détectées les vibrations d'élongation des groupes -CH_2 et -CH_3 (Tableau 10). Si la déshydratation permet de mieux révéler ces modes vibrationnels (Annexe 2), ils sont tout de même détectables aux mêmes nombres d'onde à l'état hydraté (Annexe 2). Principalement associées à la réponse des lipides, les bandes d'absorption des CH_2 sont habituellement utilisées pour quantifier ces composants. La position de ces bandes et le ratio relatif de leur intensité est également reconnue comme un indicateur fiable de la mobilité des acides gras des membranes lipidiques [160]. Dans le cadre de l'étude clinique, il sera intéressant de suivre l'évolution de ces bandes avec le vieillissement.

Dans la région spectrale [$1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$], la bande d'absorption comprise entre 1750 et 1740 cm^{-1} est généralement associée à la vibration d'élongation du groupe (C=O) des lipides estérifiés. Cette région est par ailleurs dominée par l'absorption des protéines avec les bandes caractéristiques des amides I et II entre 1700 et 1550 cm^{-1} . L'amide I, principalement due à l'élongation du groupe (C=O) du groupe amide est très sensible aux différentes structures secondaires des protéines [161], [162]. Il est à noter que la vibration de déformation du groupe hydroxyle de l'eau se situe dans la même zone et est superposée à l'amide I dans la muqueuse hydratée. Cette superposition est corroborée par la diminution de l'intensité de l'amide I pour les échantillons de muqueuse à l'état déshydraté (Annexe 3). Contrairement à l'amide I, l'amide II, principalement associée à la déformation N-H couplée à l'élongation C-N, n'est pas sensible à l'eau [163] et est largement utilisée comme pic de normalisation [164].

Dans la région inférieure à 1500 cm^{-1} , même si l'hydratation masque quelque peu les bandes d'absorption des autres composants, ces bandes intrinsèques restent détectables et sont situées aux mêmes positions qu'à l'état déshydraté (Annexe 3). Les absorptions à 1452 cm^{-1} (déformation du méthylène) et 1392 cm^{-1} (élongation du COO) proviennent à la fois des protéines et des lipides. Comme observé pour les spectres IRTF du derme et du collagène pur [131], les bandes d'absorption spécifiques du collagène à 1201 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} et 1338 cm^{-1} , respectivement attribuées à la déformation $\delta(\text{C-OH})$ de la tyrosine, à la déformation $\delta(\text{CH}_3)$ du collagène et à la déformation "wagging" $\delta_w(\text{CH}_2)$ de la proline sont clairement détectables sur les spectres de la *lamina propria*, tissu conjonctif associé à une proportion importante de collagène comme vu dans le chapitre I.

Les absorptions intenses à 1031 cm^{-1} et 1085 cm^{-1} sont respectivement attribuées aux vibrations $\nu(\text{COOC})$ de résidus d'hydrates de carbones et à $\nu(\text{C-O-C})$ des collagènes et des glycosaminoglycanes [131]. Le spectre de la *lamina propria* confirme la présence de ces macromolécules. Ces bandes reflètent également une teneur élevée en glycogène dans la *lamina propria*.

Tableau 10: Indexation des bandes IR de la lamina propria porcine

Position de la bande (cm ⁻¹)	Assignations	Références
3370-3290	Amide A : $\nu(\text{O-H})$ libre, $\nu(\text{O-H})$ lié (eau), $\nu(\text{N-H})$ libre et $\nu(\text{N-H})$ lié (protéines) Non sensible au squelette carboné ; dépendant liaisons H (inter et intramoléculaires) de l'hydratation	[131]
3080	Amide B + $\nu(\text{C-H})$ cycle aromatique	
2957, 2924, 2873, 2852	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ principalement représentatif des protéines $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ et $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ principalement représentatif des lipides	[88]
1743	$\nu(\text{C=O})$ triglycérides, esters de cholestérol, phospholipides	[101]
1630	Amide I : $\nu(\text{C=O})$ protéines et $\delta(\text{O-H})$ eau	[85]
1550	Amide II : $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{N-H})$ protéines	[85]
1393	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ acides aminés libres	[87]
1453	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ protéines et lipides	
1338	$\delta_{\text{w}}(\text{CH}_2)$ des chaînes latérales (proline), spécifique collagène	[165]
1281,1234,1205	$\delta(\text{CH}_3)$ spécifique collagène $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques $\delta(\text{C-OH})$ Tyrosine (spécifique collagène)	[96], [165], [166]
1160	$\nu(\text{C-O})$ collagène et hydrates de carbones	[101]
1079	$\nu(\text{PO}_2^-)$ groupes phosphodiester de l'ADN et phospholipides $\nu(\text{C-O})$ résidus d'hydrates de carbone du collagène et des protéoglycanes	[96]
1030	$\nu(\text{CO-O-C})$ résidus d'hydrates de carbone du collagène, des protéoglycanes et glycoaminoglycanes, glycogène	[165], [167]
970	$\nu(\text{C-C})$ Mouvements du squelette des riboses-phosphatés de l'ADN et de l'ARN	[168]

- Influence de la localisation sur la réponse vibrationnelle de la *lamina propria*

Les spectres IRTF de *lamina propria* lyophilisées de 6 muqueuses maxillaires et de 6 muqueuses mandibulaires ont été utilisées pour une analyse en composantes principales dans la zone [1460-900 cm⁻¹]. La projection des profils IRTF des profils IRTF dans la base des composantes principales PC1 et PC3 est représentée ci-après (Figure 46).

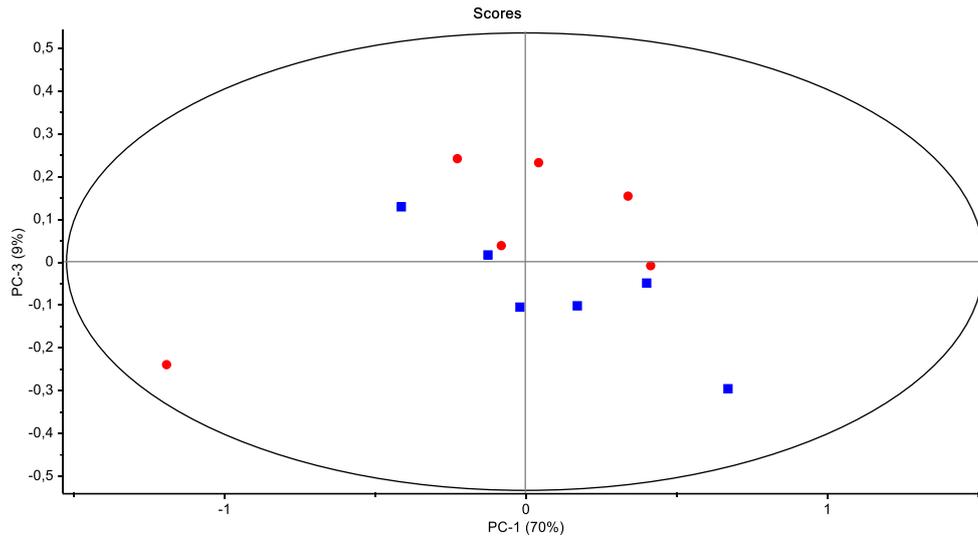


Figure 46: Projection des profils IR des échantillons lamina propria selon PC1 et PC3 ; regroupement suivant la localisation (carrés bleus ; maxillaires et ronds rouges ; mandibules)

Les profils IRTF des mandibules et des maxillaires ne se scindent pas en deux groupes distincts, signe que la réponse vibrationnelle n'est pas ou peu dépendante de la localisation.

Nous avons complété cette analyse par la comparaison des spectres de dérivée seconde et de FSD des lamina propria mandibulaires (n=3) et maxillaires (n=3) à l'état déshydraté dans la région [1750-1450 cm^{-1}] (Figure 47) dans la zone des amides I et II. Les différents minima observés mettent en évidence le caractère composite de ces deux bandes, très sensibles à la structure secondaire des protéines [160], [169].

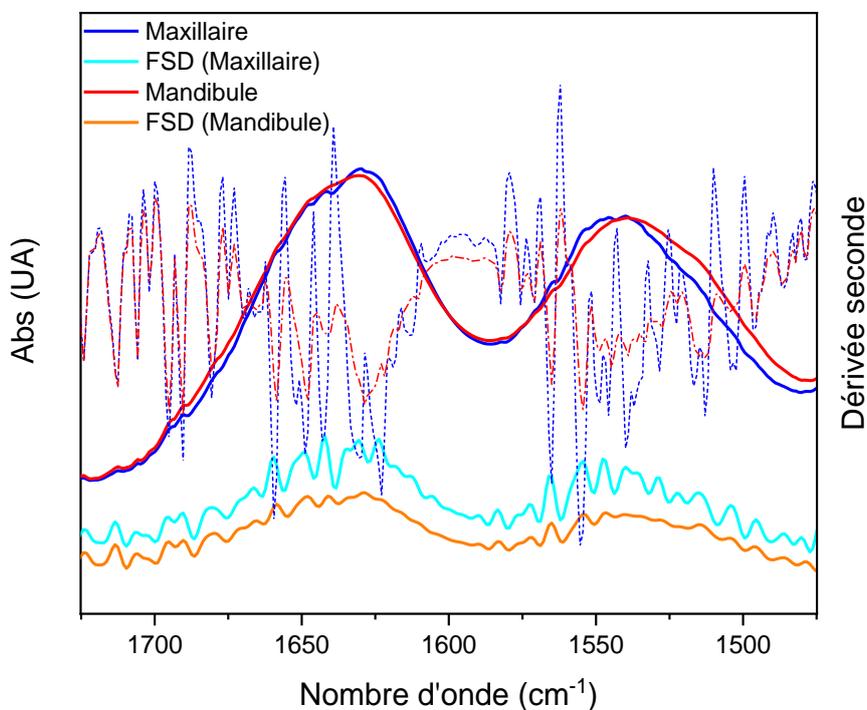


Figure 47: Spectres IRTF, FSD et dérivée seconde des échantillons de lamina propria maxillaire et mandibulaire dans la zone [1750-1450 cm^{-1}]

Le Tableau 11 reporte les différents minima des spectres de dérivées secondes et les maxima des spectres FSD de la *lamina propria* mandibulaire et maxillaire.

A titre de comparaison et pour faciliter l'indexation nous avons reporté dans le tableau les sous modes du derme humain étudié lors du travail de thèse de R. Tang [1].

Tableau 11: Position des sous-modes dans la zone des amides I et II par dérivée seconde et sur-révolution FSD (*lamina propria*)

Minima Dérivée seconde			Maxima FSD			Indexation	
Maxillaire	Mandibule	Derme Humain	Maxillaire	Mandibule	Derme Humain		
1695	1695	1694	1690	1690	1689	Feuillets β anti-parallèles	Amide I
1680	1680	1682	1680	1680	1682	Feuillets β anti-parallèles et tours β	
NA	NA	1667	1665	NA	1666	Tours, boucles non liées par liaison H	
1659	1658	1659	1659	1658	1660	Hélices α	
1649	1647	1651	1649	1647	1652	Hélices et/ou désordre	
1642	1641	1640	1642	1641	1636	Eau	
1630	NA	1627	1630	1628	1627	Feuillets β intramoléculaires	
1618	NA	1618	1618	NA	1618	Feuillets β intermoléculaires	
1554	1554	1555	1554	1553	1556	Feuillet β	Amide II
1545	1545	1543	1547	1546	1542	Hélices α , triples hélices	
1536	1536	1534	1538	1538	1534	Désordre	

Largement observé dans la littérature, la composante spectrale à 1659 cm^{-1} est attribuée aux structures en triple hélice, caractéristique de la structure hélicoïdale du collagène [170], [171], pour l'amide I. Dans la zone des amides II, la composante à 1550 cm^{-1} est généralement attribuée aux conformations en feuillets β et la composante à $1545\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ aux conformations hélicoïdales [88]. Pour le collagène natif, la structure en triple hélice a été associée à la bande 1549 cm^{-1} [172]. Ces données confirment la présence de la composante collagénique au sein de la *lamina propria*. Aucune différence notable n'est détectée entre les structures secondaires des protéines de la *lamina propria* maxillaire et mandibulaire.

III.A.1.2 Signature vibrationnelle de l'épithélium

- Indexation

Les différentes bandes d'absorptions du spectre moyen de la couche épithéliale de la muqueuse buccale (Figure 40) et leur indexation probable selon la littérature sont présentées dans le Tableau 12.

Tableau 12: Indexation des bandes IR de l'épithélium buccal porcin

Position de la bande (cm ⁻¹)	Assignations	Références
3370-3290	Amide A : $\nu(\text{O-H})$ libre, $\nu(\text{O-H})$ lié (principalement eau), $\nu(\text{N-H})$ libre et $\nu(\text{N-H})$ lié (protéines) Non sensible au squelette carboné ; dépendant des liaisons H (inter et intramoléculaires) de l'hydratation	[131]
2957, 2924, 2873, 2852	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ principalement représentatif des protéines $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ et $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ principalement représentatif des lipides	[88]
1743	$\nu(\text{C=O})$ triglycérides, esters de cholestérol, phospholipides	[101]
1670	Amide I : $\nu(\text{C=O})$ protéines et $\delta(\text{O-H})$ eau	[85]
1550	Amide II : $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{N-H})$ protéines	[85]
1455	$\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$ protéines et lipides	[88]
1395	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ acides aminés libres	[87]
1314	Amide III : $\delta_{\text{plan}}(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C-N})$ de protéines, $\nu(\text{P=O})$ lipides, acides nucléiques et phospholipides Adénine libre	[83], [131]
1242	Amide III $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques	[88]
1171-1122	$\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$ Hydrates de carbones $\nu(\text{C-O})$ glycoprotéines (dont mucine) et phospholipides	[173][174]
1081	$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques $\nu(\text{C-O})$ hydrates de carbones	[85]
1045	$\nu(\text{C-O})$, $\delta(\text{C-O})$ des hydrates de carbones (incluant le glycogène et le glucose) $\nu(\text{CH}_2\text{OH})$ mucine	[87], [167], [173]

Si nous retrouvons les bandes d'absorption classiques des protéines et lipides comme indexées pour les spectres de la *lamina propria* (Tableau 10), les spectres de l'épithélium sont caractérisés par certaines vibrations spécifiques.

L'épaulement à 1310 cm⁻¹, pourrait être associé à l'adénine comme précédemment proposé dans les tissus biologiques [83]. L'adénine est connue pour participer à la cicatrisation de la couche épithéliale. Une autre bande spécifique du profil IR de l'épithélium est le mode vibratoire $\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$ à 1171 cm⁻¹ associé aux lipides et aux hydrates de carbones. Les bandes

d'absorption localisées à 1122 cm^{-1} ($\nu(\text{C-O})$) et $1060\text{-}1040\text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{CH}_2\text{OH})$), pourraient être principalement associées à la mucine [173].

Cette glycoprotéine d'ancrage sur la surface supérieure des cellules épithéliales permet la stabilisation de la pellicule salivaire et donc une protection de la couche épithéliale [175].

- Sur-résolution des spectres des *épithélia* maxillaires et mandibulaires par dérivée seconde et FSD

La Figure 48 présente la superposition des courbes FSD et de dérivée seconde de l'*épithélium* hydraté dans la zone des amides I et II sensibles aux structures secondaires.

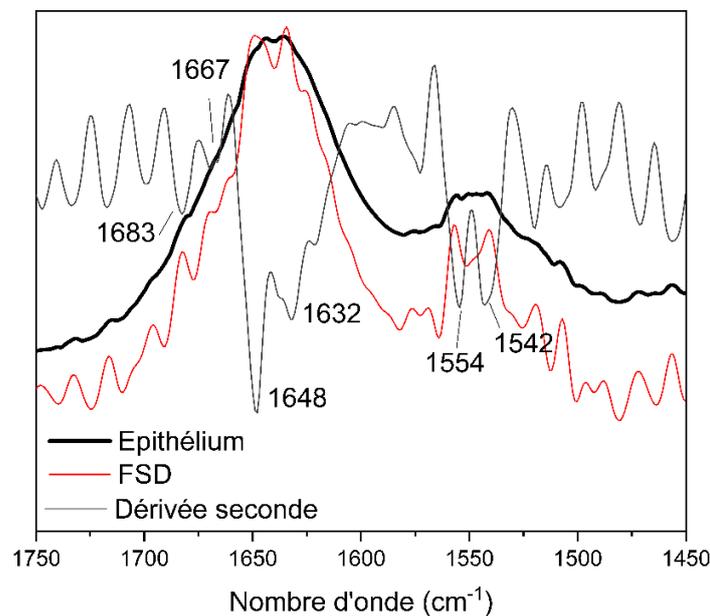


Figure 48: Spectre IRTF d'un échantillon d'épithélium buccal et son traitement par dérivée seconde et FSD dans la zone $[1750\text{-}1450\text{ cm}^{-1}]$

Si de nombreuses études ont été menées sur la caractérisation IR de l'épiderme et du *stratum corneum*, peu ont été consacrées à la caractérisation de la structure secondaire des cellules épithéliales.

Basée sur les travaux de Kreuzer et *al* (consacrés de la caractérisation des protéines des cellules épithéliales du cristallin oculaire [176]), l'indexation pour les composantes de l'amide I de l'*épithélium* buccal est proposée dans le Tableau 13.

Tableau 13: Position des sous-modes dans la zone de l'amide I par sur-révolution FSD (*épithélium*)

Maxima FSD	Indexation
1683, 1667	Tours et boucles β
1648	Hélices α
1632	Feuillets β

III.A.1.3 Définition des marqueurs vibrationnels retenus

- *Lamina propria*

Issus de nombreuses analyses vibrationnelles sur des tissus biologiques, les indicateurs vibrationnels de la *lamina propria* buccale sont décrits dans le Tableau 14. Même s'ils ne permettent pas de quantifier directement les différents composants, ces indicateurs sont proportionnels à leurs ratios et pourront donc être comparés suivant les variables catégorielles dans le cadre de l'étude clinique.

Tableau 14: Marqueurs spécifiques retenus de la lamina propria à l'état hydraté

Indicateurs vibrationnels	Variable quantitative continue mesurée
Lipides/protéines	Rapport aires 3000-2800 cm^{-1} /1540 cm^{-1}
Amide A/protéines	Rapport aires 3270 cm^{-1} /1540 cm^{-1}
Collagène/protéines	Rapport aires 1338 cm^{-1} /1540 cm^{-1}
Fraction collagène	Rapport aires 1202 cm^{-1} /1800-1000 cm^{-1}
Fraction protéique	Rapport aires 1540 cm^{-1} /1800-1000 cm^{-1}
Fraction hydrates de carbones (dont PG et GAG)	Rapport aires 1100-1000 cm^{-1} /1800-1000 cm^{-1}

Une étude quantitative a été réalisée afin de comparer la réponse vibrationnelle des *lamina propria* déshydratées de muqueuses maxillaires (n=6) et mandibulaires (n=6) à partir des spectres IRTF.

Nous avons notamment évalué l'indicateur « collagène/protéines » (Figure 49) et l'indicateur « lipides/protéines » au sein des muqueuses buccales porcines (Figure 50). Pour ces deux marqueurs vibrationnels, nous observons peu de variabilité et ces analyses préliminaires confirment la fiabilité et la pertinence des données issues des spectres IRTF-ATR.

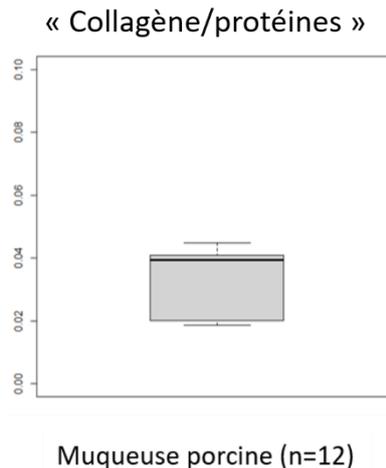


Figure 49: Boîte de dispersion de l'aire $A(1339 \text{ cm}^{-1})/A(1540 \text{ cm}^{-1})$ sur l'ensemble des lamina propria porcines

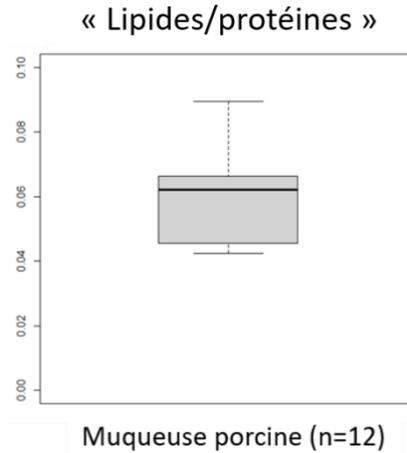


Figure 50: Boîte de dispersion de l'aire $A(3000-2800\text{ cm}^{-1})/A(1540\text{ cm}^{-1})$ sur l'ensemble des lamina propria porcines

- *Epithélium*

A partir de la réponse spectrale des *épithélia* porcins à l'état hydraté, nous avons déterminé des indicateurs vibrationnels pertinents (Tableau 15). Ces marqueurs serviront dans le cadre de l'étude clinique et seuls les résultats significatifs seront présentés dans le chapitre dédié.

Tableau 15: Marqueurs spécifiques de l'épithélium à l'état hydraté

Indicateurs vibrationnels	Variable quantitative continue mesurée
Lipides/protéines	Rapport aires $3000-2800\text{ cm}^{-1}/1540\text{ cm}^{-1}$
Acides nucléiques/protéines	Rapport aires $1241\text{ cm}^{-1}/1540\text{ cm}^{-1}$
Glycoprotéines/protéines	Rapport aires $1122\text{ cm}^{-1}/1540\text{ cm}^{-1}$
Glycogène et glucose /protéines	Rapport aires $1100-1000\text{ cm}^{-1}/1540\text{ cm}^{-1}$
Fraction protéique	Rapport aires $1540\text{ cm}^{-1}/1800-1000\text{ cm}^{-1}$
Amide A/protéines	Rapport aires $3270\text{ cm}^{-1}/1540\text{ cm}^{-1}$

III.A.2. Hydratation et domaine de stabilité thermique de la muqueuse buccale

Les analyses thermogravimétriques sont réalisées sur les échantillons de muqueuses hydratées ou lyophilisées afin d'estimer le niveau d'hydratation de ce type de tissus et de déterminer leur stabilité thermique. Le domaine de stabilité thermique permettra de fixer les limites en température des autres types de mesure (ACD et AMD en particulier).

L'échantillon (hydraté ou déshydraté) de masse 10 mg est placé dans une coupelle en alumine. La perte de masse des échantillons (hydratés ou lyophilisés) de masse initiale 10 mg, est enregistrée entre 30 °C et 800 °C pour une augmentation linéaire de la température de 10 °C min⁻¹ sous atmosphère inerte (azote).

III.A.2.1 ATG des muqueuses hydratées

La Figure 51 montre les courbes de TG et DTG typiques enregistrées pour la muqueuse buccale hydratée.

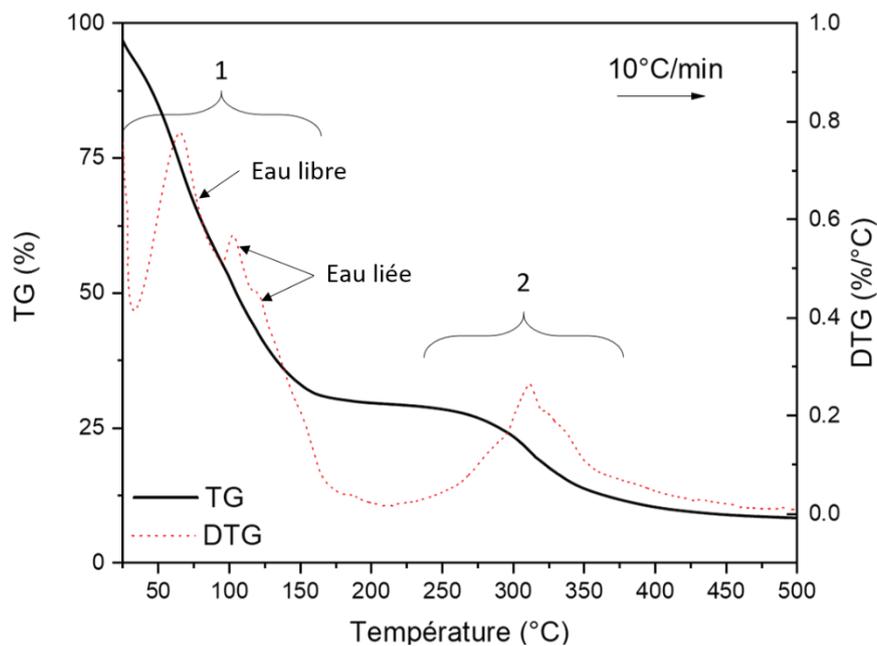


Figure 51: Courbes TG et DTG d'un échantillon de muqueuse buccale hydratée

Afin de confirmer les étapes de perte de masse et le degré d'hydratation des échantillons biologiques, il est possible d'identifier les effluents relargués lors du chauffage. Pour cela, un couplage ATG-IRTF en mode transmission est nécessaire.

Les spectres IR sont recueillis en complément de l'ATG pour 4 températures distinctes : 80, 200, 300 et 500 °C (Figure 52).

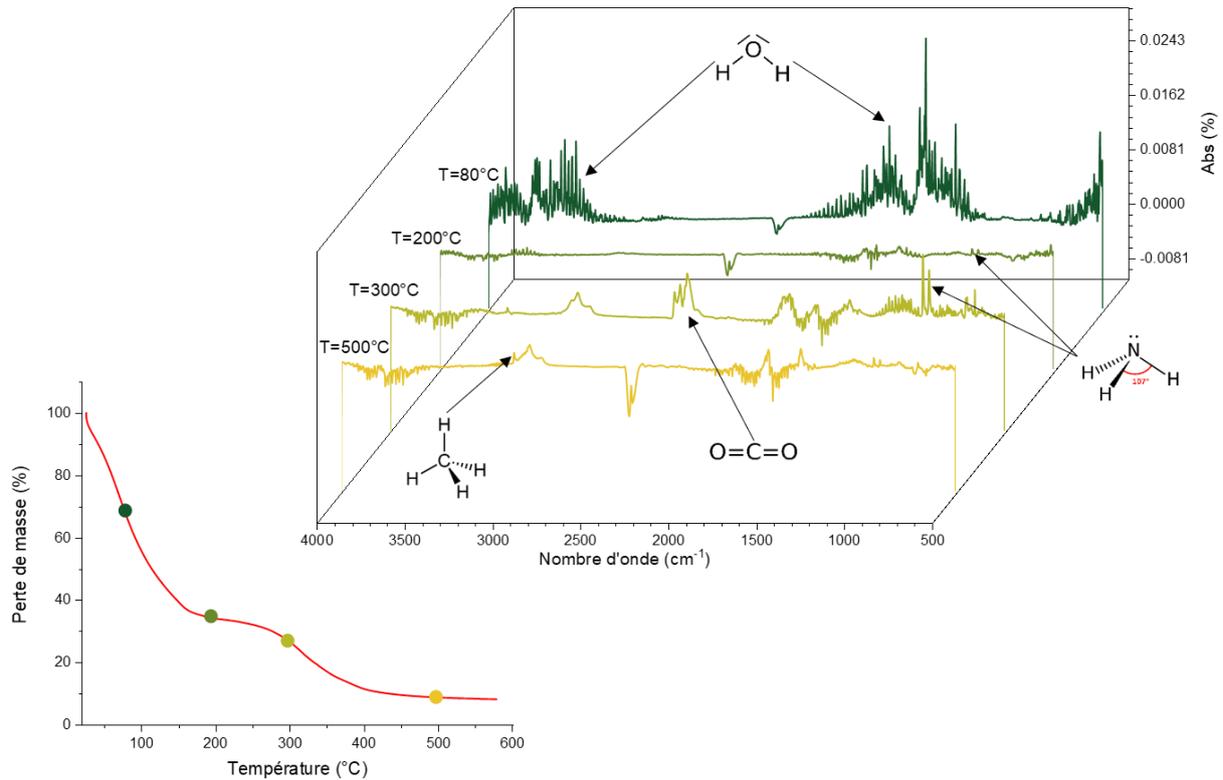


Figure 52: Profil IR des effluents relargués lors de la montée en température d'un échantillon de muqueuse buccale hydraté étudié en ATG pour 4 températures données

Par comparaison avec les données ATG d'autres tissus biologiques [2], [177], l'étape complexe de perte de masse enregistrée entre 30 et 150 °C peut être attribuée au processus de déshydratation (Figure 51) et comme confirmé par l'analyse IRTF des effluents à 80°C, correspondant à la vapeur d'eau.

Dans le cas des muqueuses hydratées, cette étape permet d'estimer la quantité d'eau totale à $71,6 \pm 2,3$ %. La courbe DTG permet de déterminer plus finement les étapes de déshydratation, avec une première étape de perte de masse entre 30 et 70 °C qui correspond principalement à l'évaporation de l'eau libre et une deuxième étape entre 70 °C et 150 °C associée à la perte d'eau fortement liée aux protéines et plus particulièrement au collagène, le principal composant de la *lamina propria*. La présence de deux pics reproductibles à 80 et 135°C sur la courbe DTG est révélatrice des différents types d'eau liée.

Cette étape de déshydratation est suivie d'un quasi-plateau entre 180 °C et 250 °C.

La deuxième étape de perte de masse entre 250 et 450 °C correspond à la dégradation des protéines par un processus complexe de désamination et de décarboxylation [178] comme confirmé par l'analyse des effluents, entre 200 et 300°C avec la présence des bandes caractéristiques de l'ammoniac et du dioxyde de carbone. Enfin, à 500°C, on observe, dans la zone $[3000-3500 \text{ cm}^{-1}]$, la bande caractéristique du méthane, étroitement liée à la dégradation de la matière organique.

III.A.2.2 ATG des muqueuses déshydratées

La Figure 53 montre les courbes de TG et DTG typiques enregistrées pour la muqueuse buccale lyophilisée.

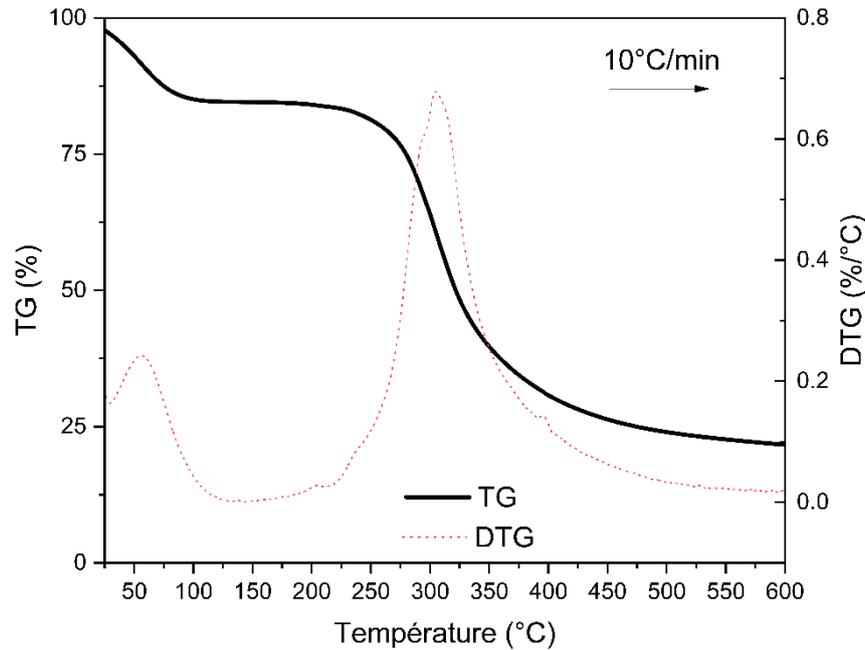


Figure 53: Courbes TG et DTG d'un échantillon de muqueuse buccale déshydratée

Pour les échantillons de mandibules lyophilisées, la perte de masse liée à la déshydratation (entre 30 et 100°C) est évidemment réduite (entre 10 et 16 %) et correspond à la perte d'eau résiduelle et/ou à l'absorption d'eau après le processus de lyophilisation. On remarque également sur la courbe dérivée un pic de faible intensité au-dessus de 200°C, qui peut être adressé à de l'eau plus confinée, comme les molécules d'eau à l'intérieur de la triple hélice de collagène.

La dégradation protéique est visible entre 250 et 500°C. Quel que soit le degré d'hydratation de l'échantillon, le plateau suivant la déshydratation est directement corrélé à la stabilité thermique du réseau protéique des échantillons biologiques.

Ces résultats de thermogravimétrie permettent de définir le protocole d'étude qui sera appliqué en ACD : les mesures ACD seront effectuées en-dessous de 85 °C en utilisant des coupelles hermétiques pour les échantillons hydratés, et en dessous de 240 °C pour les échantillons lyophilisés.

III.A.3. Organisation hydrique et structure physique des protéines de la muqueuse buccale

III.A.3.1 ACD des muqueuses hydratées

Les échantillons de muqueuse hydratée (5-15 mg en masse), scellés dans des coupelles hermétiques en aluminium, sont soumis à un programme de température sous atmosphère inerte d'hélium :

- Refroidissement n°1 : de 20 à -100 °C à 10 °C min⁻¹
- Chauffe n°1 : de -100 à 85 °C à 10 °C min⁻¹
- Refroidissement n°2 : de 20 à -100 °C à 10 °C min⁻¹
- Chauffe n°2 : de -100 à 85 °C à 10 °C min⁻¹

La Figure 54 présente les courbes ACD typiques (normalisées à la masse initiale) de la muqueuse buccale hydratée. Seuls les refroidissement 1 et chauffe 1 sont présentés.

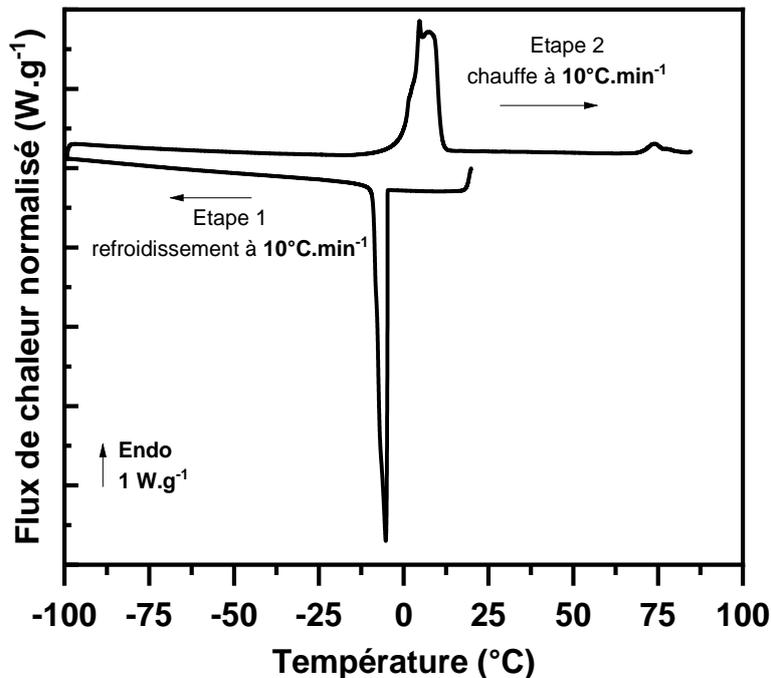


Figure 54: Courbe ACD d'un échantillon de muqueuse buccale hydratée : premier refroidissement suivi d'une première chauffe

- Organisation hydrique

Comme déjà observé dans de nombreux tissu biologiques [179] dont le derme [131], le pic exothermique enregistré entre 0 et -10 °C lors du refroidissement correspond à la cristallisation de l'eau congelable, tandis que le pic endothermique entre 0 et 20 °C enregistré lors du chauffage est associé à la fusion de cette eau préalablement gelée.

Le pic endothermique associé à la fusion de la glace est largement utilisé pour estimer la quantité d'eau cristallisable dans les protéines et les tissus hydratés (en divisant la surface du pic endothermique mesuré par 334 J.g⁻¹, correspondant à l'enthalpie de fusion de la glace pure à 0 °C) [130].

Après les mesures ACD, les coupelles hermétiques sont repesées pour vérifier qu'elles étaient correctement scellées. Les capsules sont ensuite percées et mises à l'étuve à 105 °C pendant 14 h pour déterminer la masse sèche de l'échantillon et par différence la quantité totale d'eau dans les échantillons hydratés.

Cette quantification est effectuée pour l'ensemble des échantillons de muqueuses maxillaires et mandibulaires. Les résultats associés sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16: Organisation hydrique des muqueuses buccales maxillaires et mandibulaires

Moyenne ± SD	Eau totale %	Eau cristallisable %	Eau non cristallisable %
Maxillaire	79.7 ± 5.2	54.8 ± 4.5	25 ± 3.5
Mandibule	68.7 ± 5	43.2 ± 9.5	25.5 ± 5.3
p-value	p<0.005	p<0.05	p>0.05

L'hydratation totale de la muqueuse buccale est en accord avec la quantification issue de l'analyse ATG. Avec des valeurs comprises entre 68 et 80 %, cette proportion est cohérente avec les données de la littérature sur les autres types de tissus biologiques [130], [131], peu de données existant pour la quantité totale d'eau totale de la muqueuse buccale. Correspondant à approximativement 2-4 g d'eau par g de masse sèche, cette valeur élevée est due, comme dans le cas du derme, à une combinaison de facteurs à la fois structurels - comme le système de mésopores interconnectés- et chimiques -comme l'hydrophilie du collagène et des GAG dans la *lamina propria* [131].

En outre, la littérature ne précise pas la quantification des différents types d'eau (cristallisable et non cristallisable) dans la muqueuse buccale. En calorimétrie, le terme d'eau « cristallisable » est parfois préféré [58] au terme d'eau « libre » plutôt réservé aux techniques vibrationnelles [180]; par la suite, nous assimilerons l'eau libre à l'eau cristallisable. De la même façon, seront assimilés les termes d'eau « non cristallisable » et d'eau « liée ».

Cette étude thermique indique que l'eau libre, qui comprend à la fois l'eau en masse et l'eau confinée dans les mésopores, représente un peu moins des deux tiers de l'eau totale dans la muqueuse buccale, comme dans la peau [131]. Un autre tiers de l'eau représente l'eau liée, qui correspond généralement à la première enveloppe d'hydratation des sites protéiques [181], [182] et d'autres composants hydrophiles tels que les GAG de la *lamina propria* [26], [183].

Il est important de noter que la quantité d'eau liée ne dépend pas de la localisation (maxillaire ou mandibule), ce qui peut s'expliquer par la similarité de la composition de la matrice

extracellulaire dans ces tissus. En revanche, il faut souligner que la quantité d'eau libre et la quantité totale d'eau sont significativement plus élevées dans la muqueuse maxillaire que dans la muqueuse mandibulaire. Cette variation de l'organisation hydrique avec la localisation pourrait être due à l'organisation physiologique de la muqueuse buccale.

En effet, les lambeaux de muqueuses sont prélevés en pleine épaisseur et au sein de la cavité buccale, la muqueuse maxillaire est plus épaisse que la muqueuse mandibulaire. Ainsi pour des biopsies de même diamètre, le rapport surface/volume est élevé pour les échantillons mandibulaires que pour des échantillons maxillaires, pouvant entraîner une déshydratation lors de l'extraction. Enfin, l'os maxillaire étant un os spongieux, la vascularisation ostéo-muqueuse est plus intense que dans la mandibule [184]. Cette vascularisation entraîne ainsi plus d'échanges hydrique au sein de la *lamina propria* maxillaire et donc pourrait expliquer cette différence d'hydratation entre les muqueuses maxillaires et les mandibulaires.

- Dénaturation du collagène

La Figure 55 montre un agrandissement des thermogrammes ACD correspondant à la première et à la deuxième montée en température pour les échantillons de muqueuse buccale hydratée dans la zone [60-85°C].

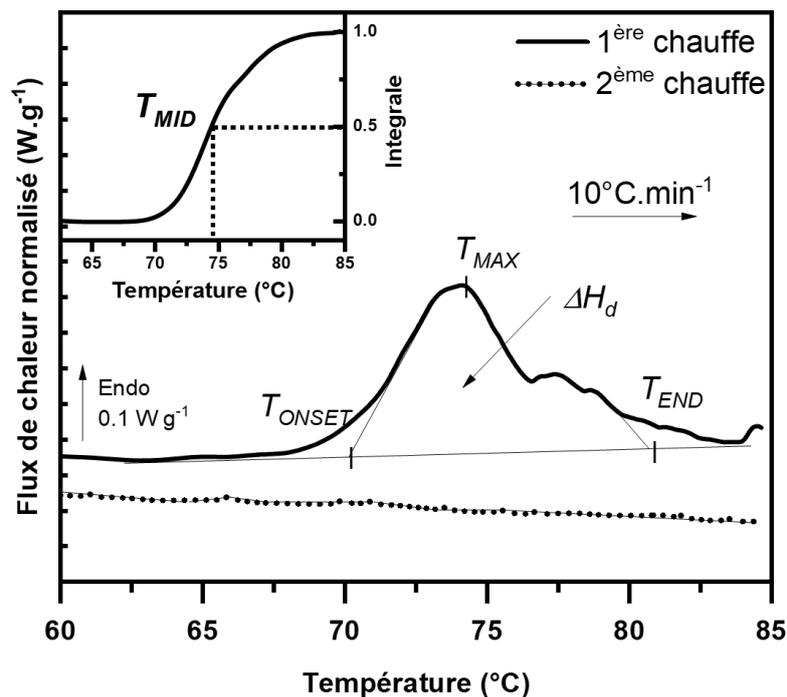


Figure 55: Courbe ACD de muqueuse buccale hydratée, entre 60 et 85°C : première et seconde chauffe

Comme l'ont déjà montré les travaux antérieurs sur d'autres tissus biologiques riches en collagène tels que la peau [126], [132], le péricardium [129], un phénomène endothermique similaire est détecté dans cette zone lors du premier chauffage et associé à la dénaturation thermique irréversible des collagènes de type I et de type III.

Il est à noter que d'autres composants tissulaires tels que les lipides présentent des transitions thermiques réversibles dans la fenêtre [30-80°C] [185]. Comme aucun événement thermique réversible n'est observé dans cette zone lors des chauffages successifs, nous pouvons sans ambiguïté attribuer cet endotherme complexe de la première chauffe à la dénaturation du collagène dans la muqueuse buccale. Cette signature thermique nous permet de confirmer que la muqueuse buccale contient peu de lipides, en particulier dans la couche majoritaire, la *lamina propria*.

La dénaturation du collagène - distincte de la dégradation - est un processus activé thermiquement qui révèle l'ordre à longue distance existant dans ce biopolymère. L'élévation de température favorise la rupture des liaisons hydrogène couplant les trois chaînes α , entraînant l'effondrement de la structure en triple hélice. La configuration résultante de chaînes désordonnées [186] est appelée gélatine (Figure 56).

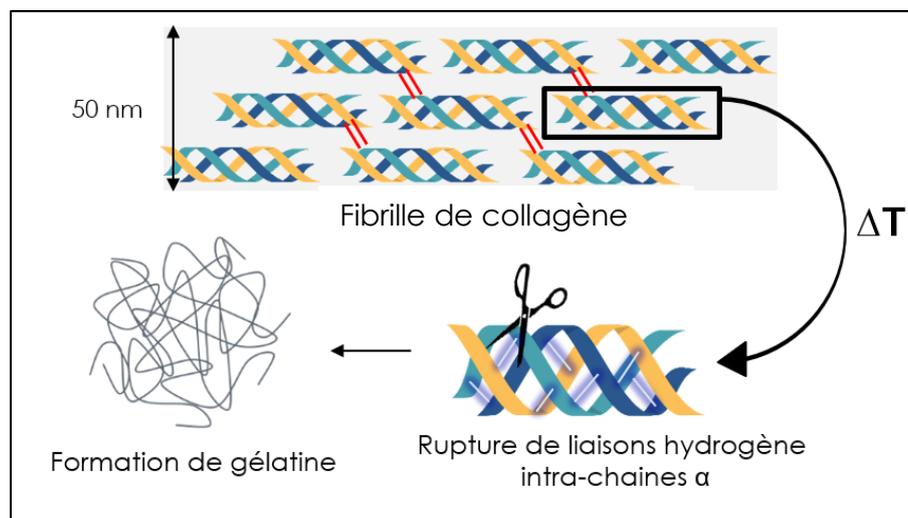


Figure 56: Processus de dénaturation des domaines en triple hélice du collagène à l'état hydraté

Nous pouvons observer que l'endotherme de dénaturation du collagène de la muqueuse buccale porcine est constitué de multiples pics de dénaturation, comme déjà rapporté dans la littérature pour d'autres types de tissus riches en collagène [136], [187]. Cette "fusion" séquentielle peut être attribuée à une distribution de molécules de collagène présentant différents degrés de stabilité thermique [188]. Selon certains auteurs [140], il existe une corrélation entre la multiplicité de cette dénaturation et la présence de différentes liaisons transversales (liaisons transversales labiles et liaisons transversales thermiquement stables) dans la protéine.

Un des paramètres caractéristiques de la dénaturation du collagène est l'enthalpie ΔH_d , correspondant à l'aire de l'endotherme de dénaturation. L'enthalpie de dénaturation représente le nombre net de liaisons hydrogène intra chaînes de l'hélice α rompues lors de la chauffe et peut être associé dans certain cas à la fraction collagénique contenu dans le tissu. Pour une comparaison plus aisée nous avons choisi de la normaliser par rapport à la masse sèche de l'échantillon. Les valeurs correspondantes sont indiquées dans le Tableau 17 et ne diffèrent pas avec la localisation. Elle peuvent être comparées aux valeurs, plus élevées, de l'enthalpie de dénaturation déterminés pour des échantillons de peaux humaine (autour de 13 J.g⁻¹ de tissu sec pour le derme humain [1] et autour de 6,5 J.g⁻¹ de tissu sec pour la muqueuse buccale humaine).

Comme reporté dans les études précédentes [126], [131], [189], les principales caractéristiques en température du pic de dénaturation sont T_{ONSET} , T_{MAX} , T_{MID} et T_{END} .

Ces quatre valeurs de température sont nécessaires pour décrire la distribution de l'endotherme complexe de dénaturation et permettent d'évaluer la stabilité thermique de la triple hélice.

T_{ONSET} , T_{END} et T_{MAX} sont respectivement les températures de début, de fin et du maximum du pic endothermique. La T_{MID} est la température à laquelle 50 % du collagène est dénaturé (déterminée à partir de l'intégrale de l'endotherme de dénaturation) et elle varie en fonction de la quantité des différentes liaisons transversales du collagène.

Les valeurs moyennes de ces différentes températures de dénaturation pour les muqueuses mandibulaires et maxillaires sont indiquées dans le Tableau 17. Il est à noter que ces températures caractéristiques correspondent bien à la plage de température de dénaturation enregistrée pour les tissus hydratés riches en collagène tels que le péricarde [129], [158] et la peau [132], [139].

Tableau 17: Paramètres de dénaturation thermiques du collagène des muqueuses buccales maxillaires et mandibulaires

Moyenne±SD	$T_{ONSET}/^{\circ}\text{C}$	$T_{MID}/^{\circ}\text{C}$	$T_{MAX}/^{\circ}\text{C}$	$T_{END}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_d/\text{J g}^{-1}$
Maxillaire	64.6 ± 6.6	69.6 ± 3.1	71.4 ± 3.6	74 ± 3.5	8.7 ± 4.2
Mandibule	71.3 ± 4	75.5 ± 3.6	75.5 ± 3.8	79.6 ± 4.6	9.1 ± 2.7
p-value	$p>0.05$	$p<0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$

Nous relevons que la température de dénaturation T_{MID} (qui décrit finement l'endotherme) est significativement plus élevée dans la muqueuse mandibulaire que dans la muqueuse maxillaire.

Comme première explication, nous suggérons que l'hydratation accrue de la muqueuse maxillaire entraîne cette chute de la température de dénaturation T_{MID} . En effet, comme illustré sur la Figure 30, des études calorimétriques antérieures sur d'autres types de tissus collagéniques hydratés [138], [190] ont montré que la température de dénaturation est très dépendante de l'hydratation : alors que cette température est de l'ordre de 65°C pour un tissu natif, hydraté, elle s'élève jusqu'à 220°C pour un tissu lyophilisé. Cette très forte dépendance de la température de dénaturation avec l'hydratation s'explique par la compaction des fibres avec la diminution de l'eau intra fibrillaire, et par la substitution, lors de la déshydratation, des liaisons hydrogène-protéines-eau par des liaisons hydrogènes-protéines (Figure 6).

Ces études révèlent aussi que la température de dénaturation devient indépendante de l'hydratation à partir d'un certain degré d'hydratation. La Figure 57 montre qu'au-dessus de 30 moles d'eau par triplet de moles de collagène (ce qui correspond approximativement à 1,8 g d'eau par g de tissu sec), la température de dénaturation du collagène atteint une valeur seuil minimale.

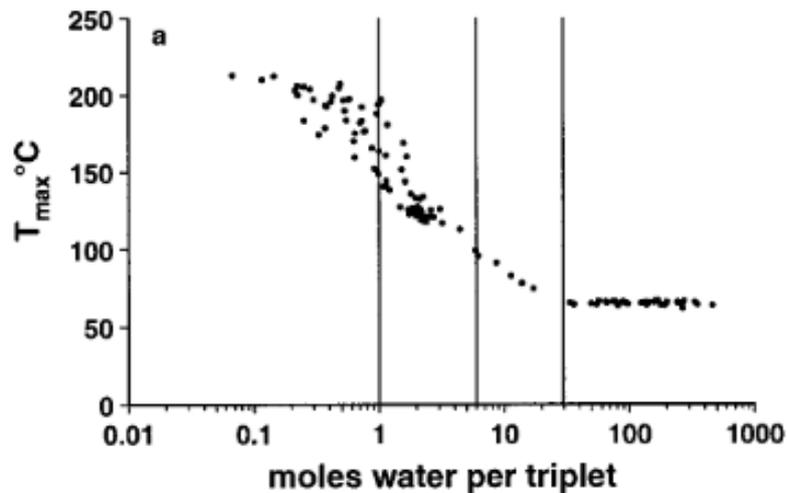


Figure 57: Influence de l'hydratation sur la température de dénaturation du collagène natif [45]

Or nous avons précédemment évalué que les échantillons de muqueuse hydratés contenaient plus de 2 g d'eau totale par g de masse sèche : condition d'hydratation pour laquelle la température de dénaturation devient constante, indépendante de l'hydratation. L'hydratation plus faible du lambeau mandibulaire ne peut donc expliquer l'augmentation de sa température de dénaturation.

III.A.3.2 ACD des muqueuses déshydratées

La caractérisation thermique de la muqueuse buccale est aussi effectuée à l'état lyophilisé. Même si l'information sur l'organisation hydrique du tissu natif est perdue dans ce cas, les travaux antérieurs ont montré que ces mesures permettaient d'accéder aux paramètres des thermiques intrinsèques du collagène [187], [191].

Les échantillons sont soumis au programme de température suivant sous atmosphère inerte (hélium) :

- Refroidissement n°1 : de 10°C min⁻¹ de 20 à 240°C à 10 °C min⁻¹
- Chauffe n°1 : de 240 à 20 °C à 10 °C min⁻¹
- Refroidissement n°2 : 25 à 240°C à 10 °C min⁻¹
- Chauffe n°2 : de 240°C à 20°C à 10 °C min⁻¹

Les thermogrammes ACD caractéristiques de la muqueuse buccale lyophilisée correspondant au 1^{er} et 2^{ème} balayage entre 20 et 240 °C sont présentés sur la Figure 58.

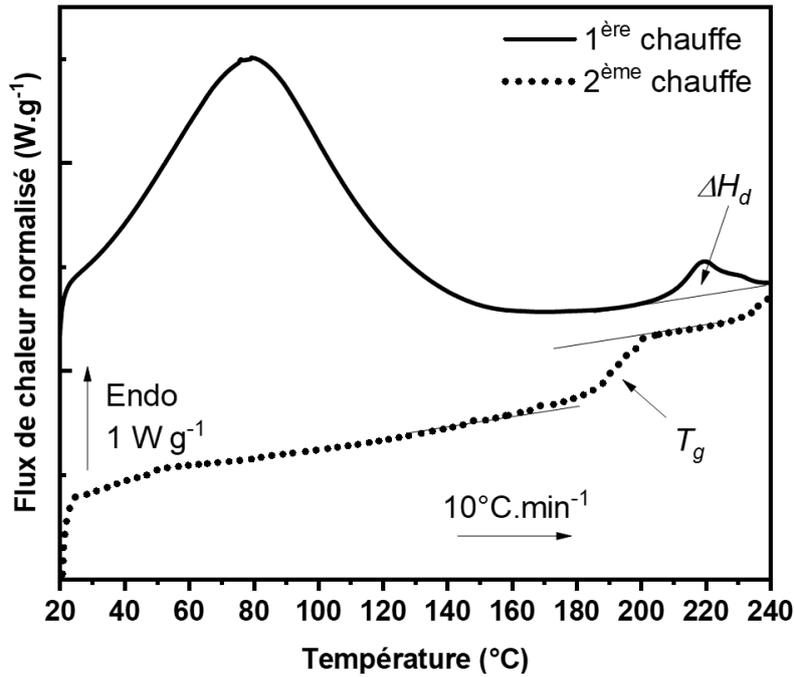


Figure 58: Courbe ACD de muqueuse buccale déshydraté, première et deuxième chauffe à 10°C/min

L'allure globale des thermogrammes ACD est similaire à celle précédemment reportée pour les tissus lyophilisés riches en collagène [192]. Lors de la première chauffe, le large événement endothermique qui se produit entre 25 et 150 °C est associé à la perte de l'eau étroitement liée qui subsiste après la lyophilisation ou récupérée lors de la conservation de l'échantillon et détectée par ATG comme décrit dans le paragraphe précédent.

La Figure 59 montre un agrandissement de ces thermogrammes ACD dans la zone [170-240 °C].

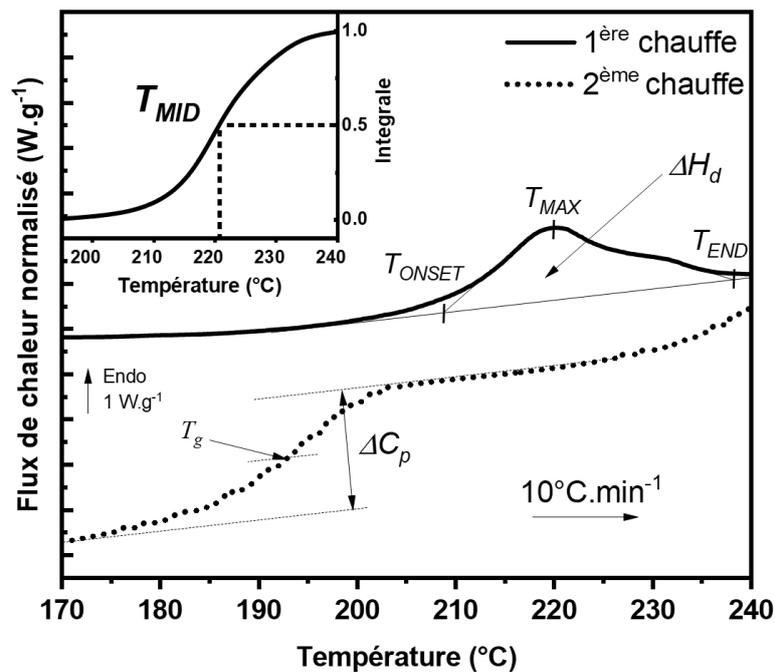


Figure 59: ACD de la muqueuse buccale déshydratée dans la zone [170-240°C], premier et second balayage

Le phénomène endothermique observé entre 200 et 240 °C est attribué à la dénaturation du collagène des muqueuses maxillaires/mandibulaires et ses paramètres caractéristiques T_{ONSET} , T_{MAX} , T_{END} , T_{MID} et ΔH_d sont reportés dans le Tableau 18. Comme pour l'état hydraté, le phénomène de dénaturation est multiple, avec un épaulement à haute température.

Tableau 18: Paramètres de stabilité thermiques des muqueuses buccales maxillaires et mandibulaires

Moyenne± SD	$T_{ONSET}/^{\circ}C$	$T_{MAX}/^{\circ}C$	$T_{MID}/^{\circ}C$	$T_{END}/^{\circ}C$	$T_g/^{\circ}C$	$\Delta H_d/J g^{-1}$
Maxillaire	206.6 ± 0.4	217.5 ± 0.3	219.1 ± 0.3	235.6 ± 0.4	198.1 ± 1.3	14.7 ± 0.2
Mandibule	209.2 ± 1.3	220.4 ± 0.3	221.2 ± 0.4	236.4 ± 0.8	197.1 ± 1.6	15.9 ± 0.5
p-value	$p \sim 0.05$	$p < 0.005$	$p < 0.005$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p \sim 0.05$

Les valeurs trouvées pour la température T_{MAX} sont en bon accord avec les données de la littérature, et l'augmentation considérable de la température de dénaturation avec la déshydratation corrobore ces données [126], [138]. Ce phénomène de dénaturation, irréversible, n'est pas détecté lors des balayages successifs. Une transition de pseudo-ordre est détectée entre 170 et 220 °C sur les chauffes successives et attribuée à la transition vitreuse du collagène dénaturé, la gélatine, avec ses paramètres caractéristique T_g et ΔC_p .

Nous observons une augmentation ΔH_d (en limite de significativité) au niveau des mandibules par rapport aux maxillaires.

Il est intéressant de noter que la transition vitreuse de la gélatine n'est pas détectée lors du second chauffage à l'état hydraté. Des études calorimétriques antérieures réalisées sur des gélatines différemment hydratées ont montré une forte diminution de la température de transition vitreuse avec l'hydratation [193]. Extrapolée à 80 % d'hydratation, la transition vitreuse de la gélatine se situe aux alentours de 0 °C et doit donc être cachée sous le pic de fusion dans nos expériences à l'état hydraté.

Comme à l'état hydraté, les températures T_{MAX} et T_{MID} sont significativement plus élevées pour les muqueuses mandibulaires à l'état lyophilisé. Cela corrobore le fait que ce n'est pas la différence d'hydratation qui pouvait expliquer cette différence de stabilité thermique.

D'autres facteurs peuvent être pris en compte, tels qu'une différence dans les réticulations covalentes du collagène, ou encore une légère différence dans la composition moléculaire de la muqueuse maxillaire et mandibulaire (des protéines comme l'élastine peuvent influencer la dénaturation thermique du collagène, comme reporté pour le collagène péri-médial [189]).

La température de transition vitreuse T_g est quant à elle indépendante de la localisation, ce qui est apparaît cohérent puisqu'associée uniquement au désordre et non reliée à l'organisation initiale des triples hélices.

III.A.3.3 Définition des marqueurs thermiques retenus

Les analyses calorimétriques diathermes des muqueuses buccales porcines ont permis de définir une liste d'indicateurs thermiques et hydriques pertinents.

Etant donné que les échantillons buccaux sont analysés à l'état hydraté dans le cadre de l'étude clinique, seuls les biomarqueurs relatifs aux tissus hydratés sont reportés dans le Tableau 19.

Tableau 19: Indicateurs thermiques spécifiques de la muqueuse buccale à l'état hydraté

Indicateur thermique	Variable quantitative continue mesurée
Stabilité thermique du collagène	T _{ONSET} : Température (°C) de début du pic de dénaturation dans la zone [60-80°C]
	T _{END} : Température (°C) de fin du pic de dénaturation dans la zone [60-80°C]
	T _{MAX} : Température (°C) maximale du pic de dénaturation dans la zone [60-80°C]
	T _{MID} : Température (°C) à partir de laquelle le collagène se dénature de moitié dans la zone [60-80°C]
Structure du collagène	Aire (J/g) de la zone [60-80°C]
Organisation hydrique	Pourcentage d'eau libre
	Pourcentage d'eau liée
	Pourcentage d'eau totale
	Rapport eau liée/eau libre

III.A.4. Signature viscoélastique

L'objectif est d'évaluer le caractère viscoélastique en cisaillement de biopsies de faible dimension par des tests oscillatoires à faible amplitude de déformation. Comme précisé dans le chapitre II, l'analyse mécanique dynamique des biopsies est effectuée en géométrie plan-plan, en immersion dans une solution de sérum physiologique thermostatée afin de reproduire les conditions d'hydratation de la cavité buccale et d'assurer l'intégrité des échantillons.

III.A.4.1 Test de cisaillement sur les échantillons de muqueuse buccale porcine

Nous cherchons dans un premier temps à déterminer de façon reproductible les modules de conservation (G') et de perte (G'') en fonction de la déformation (de 0,01 à 2%), dans les conditions physiologiques d'hydratation, de température et de sollicitation (fréquence 0,1 Hz et 1 Hz). Il s'agit dans cette première étude d'appréhender l'influence de différents paramètres sur le comportement viscoélastique des muqueuses buccales tels que : la **force axiale** appliquée, l'**épaisseur** des échantillons, la **localisation** du prélèvement, l'influence de la **couche constitutive** et l'effet de la **température**.

- Influence de la force axiale et de la fréquence

L'évolution du comportement des tissus lors du préconditionnement est liée aux changements de la structure macromoléculaire. Il est donc nécessaire d'évaluer les conditions de précontraintes adéquates afin que les biopsies s'adaptent à une charge mécanique et retrouvent leurs propriétés d'origine lorsque la charge est ôtée.

Afin d'assurer un maintien de la biopsie, un bon contact avec les géométries et des mesures reproductibles, il est nécessaire (en mode cisaillement) d'appliquer une force axiale dont la valeur optimale doit être déterminée. Les données de la littérature disponibles sur des tissus ovins et porcins précisent que la réduction de la précontrainte en dessous de 2 kPa (soit 10g ou 0,1N sur 50mm²) ne permet ni d'obtenir un signal correct, ni le maintien optimal de l'échantillon entre les géométries [194].

Dans notre cas, les biopsies sont, au préalable, déposées entre les géométries sans contrainte, et un délai de 10 min est respecté avant l'application de la force axiale correspondant à la relaxation d'éventuelles contraintes au sein de l'échantillon.

La Figure 60 présente la variation des modules G' et G'' pour des biopsies de lambeaux mandibulaires obtenus lors des balayages en déformation pour deux gammes de forces axiales distinctes : 0,76 N et 0,13N (Figure 60A et B) et à deux fréquences de sollicitation.

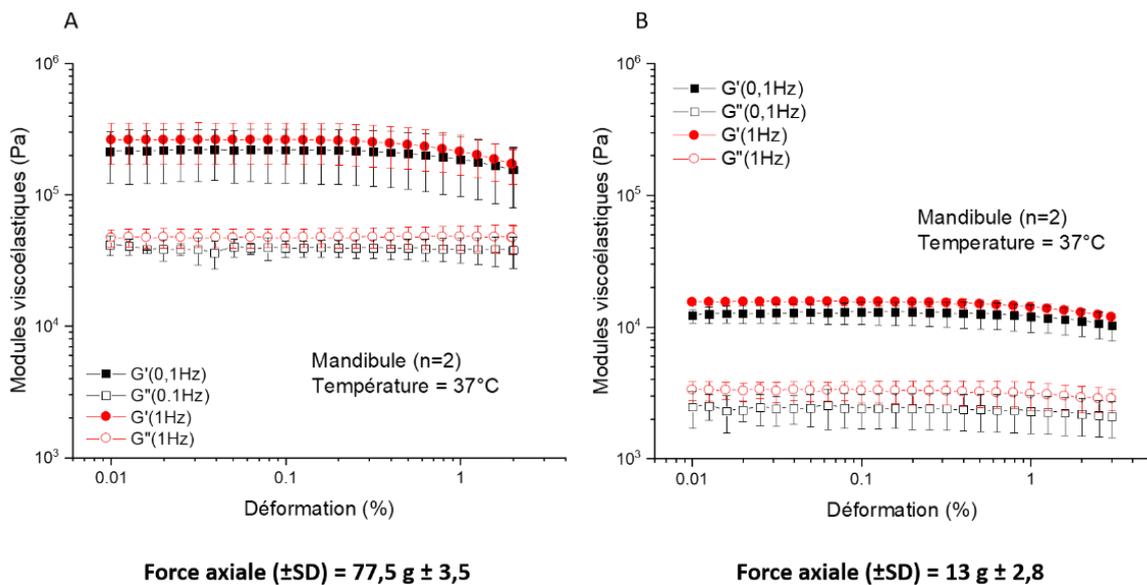


Figure 60: Influence de la force axiale sur l'évolution des modules G' et G'' d'échantillon de muqueuses mandibulaires au cours d'un balayage en déformation

Nous notons que la force axiale a une influence très importante sur les valeurs des modules de conservation et de perte : à fréquence et à déformation donnée, une augmentation d'un facteur 5 de la force axiale entraîne une augmentation d'un facteur 30 de G' et d'un facteur 4 de G'' . Une force axiale élevée modifie ainsi le comportement viscoélastique des muqueuses, qui deviennent de plus en plus solides avec des valeurs de modules anormalement élevées

Nous avons fixé pour la suite de l'étude en mode cisaillement la force axiale de 0,10 N ± 0,10 (contrainte de cisaillement environ égale à 1 kPa), qui correspond à la limite basse contrôlable par le rhéomètre.

Enfin, à force axiale donnée, nous observons une augmentation des modules viscoélastiques avec la fréquence de sollicitation. Il peut être intéressant de conserver quand c'est possible ces 2 fréquences d'étude, la fréquence de sollicitation de 0,1 Hz permettant de se rapprocher d'un état statique de la muqueuse tandis que la fréquence de 1 Hz est proche des conditions masticatoires. L'augmentation des modules avec la fréquence est cohérente avec les données de la littérature sur d'autres types de tissus biologiques ou encore sur les propriétés mécaniques des macromolécules en général, avec un comportement tendant vers le solide élastique quand la fréquence augmente [195], [196].

- Influence de l'épaisseur

Il est à noter une variabilité de l'épaisseur des lambeaux de muqueuses buccales. En effet, ces lambeaux ont été prélevés sur différents animaux et il est intéressant de déterminer l'influence de l'épaisseur du lambeau (et donc de la biopsie) sur la réponse viscoélastique. Ainsi, nous comparons les modules de conservation et de perte de biopsies mandibulaires d'épaisseurs moyennes comprises entre 1,86 et 1,37 mm (Figure 61).

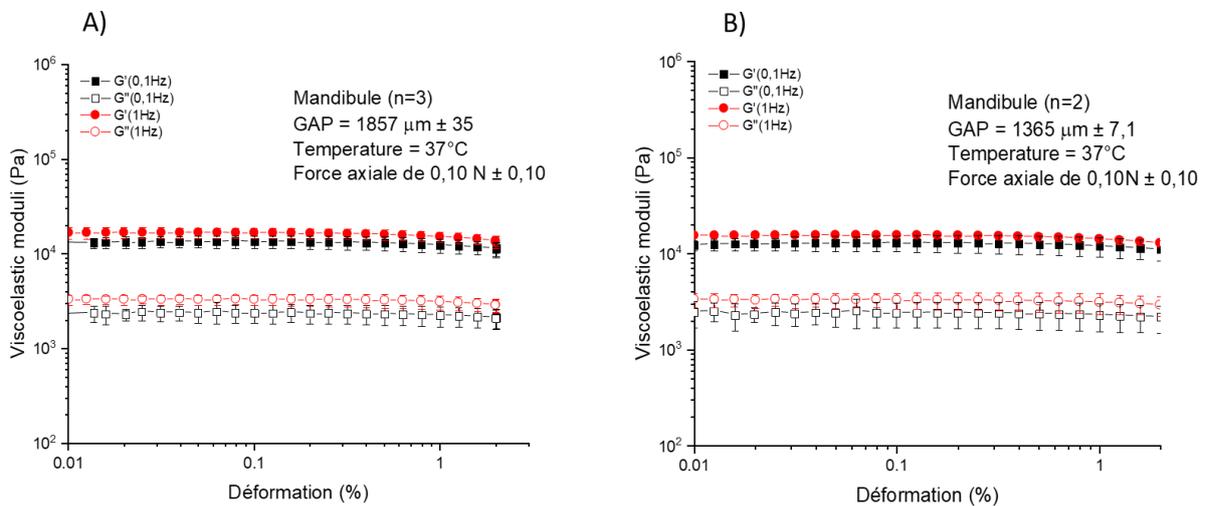


Figure 61: Influence de l'épaisseur du prélèvement sur l'évolution des modules G' et G'' au cours d'un balayage en déformation (A : biopsie d'épaisseur 1,86mm ; B : biopsie d'épaisseur 1,37 mm)

Cette comparaison permet d'affirmer que l'épaisseur des biopsies mandibulaires n'a pas d'influence sur la valeur des modules conservatifs et de perte dans la gamme de déformation [0,01-2%] et aux fréquences considérées.

- Influence de la localisation du prélèvement

Afin de mettre en évidence l'impact de la localisation du prélèvement sur le comportement viscoélastique de la muqueuse buccale, nous comparons les valeurs moyennes des modules viscoélastiques des lambeaux maxillaires et des lambeaux mandibulaires lors de balayages en déformation dans les mêmes conditions de précharge, de température, de fréquence et de déformation (Figure 62).

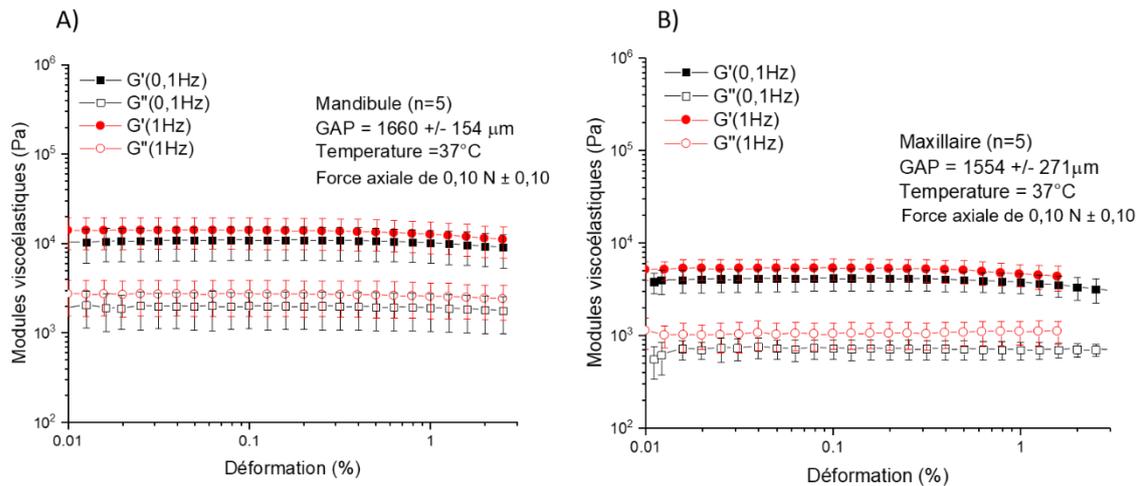


Figure 62: Influence de la localisation du prélèvement sur l'évolution des modules G' et G'' au cours d'un balayage en déformation

Nous notons qu'à fréquence et déformation donnée, les modules G' et G'' des lambeaux mandibulaires sont toujours supérieurs à ceux des lambeaux maxillaires.

Les études de tissus rénaux [195] ou cartilagineux [197] par analyse mécanique dynamique reportent une augmentation des modules viscoélastiques pour des échantillons sous hydratés voire déshydratés.

Les résultats des analyses thermogravimétriques et calorimétriques mettent en évidence une différence d'hydratation des échantillons muqueux : les lambeaux mandibulaires contiennent une plus faible quantité d'eau totale et d'eau libre que les lambeaux maxillaires [198]. Ainsi, l'augmentation des modules pour les lambeaux mandibulaires pourrait être due à cette plus faible hydratation. De plus, l'augmentation de la stabilité thermique du collagène mise en évidence par analyse calorimétrique pour les lambeaux mandibulaires peut être corrélée à cette augmentation de module.

Pour chaque balayage en déformation effectué et aux fréquences de 0,1 et 1 Hz, la déformation critique est relevée. Il s'agit de la déformation à partir de laquelle contrainte et déformation ne sont plus liées par une relation linéaire. A 0,1 Hz, les déformations critiques sont de 0,6% pour les échantillons mandibulaires et 0,76% pour les échantillons maxillaires. A 1 Hz la déformation critique est de 0,5 % pour les échantillons maxillaires et mandibulaires.

Pour la suite des essais et afin de solliciter nos échantillons dans le domaine de viscoélasticité linéaire quelle que soit la fréquence de sollicitation, les balayages en fréquence ont été effectués à 0,1% de déformation. Outre les valeurs de modules viscoélastiques, les valeurs de déformations critiques pourraient être considérées comme un potentiel marqueur de l'endommagement de la muqueuse buccale.

- Influence de la couche constitutive des biopsies

La muqueuse buccale se compose de la *lamina propria* et de l'*épithélium*, couches à la fonctionnalité et à la composition très distincte ; il nous paraît pertinent de déterminer le comportement viscoélastique de chacune de ces couches afin d'évaluer leur contribution au comportement mécanique global de la muqueuse.

Les couches constitutives des biopsies sont séparées à l'aide d'un bistouri et analysées en mode cisaillement dans les conditions précédemment retenues ($F_a=1N$, $T=37^\circ C$ et $f=1Hz$).

Nous reportons sur la Figure 63 l'évolution des modules de conservation et de perte pour la *lamina propria* et l'*épithélium* lors d'un balayage en déformation. Le Tableau 20 présente les ratios volumiques des couches étudiées.

Tableau 20: Volume et ratio volumique des échantillons mandibulaires (biopsie, lamina propria et épithélium) en mm^3

	Biopsie (n=3)	Lamina propria (n=3)	Epithélium (n=3)
Volume (mm^3)	$112,5 \pm 14$	$67,6 \pm 8$	$44,8 \pm 6$
Ratio volumique		60%	40%

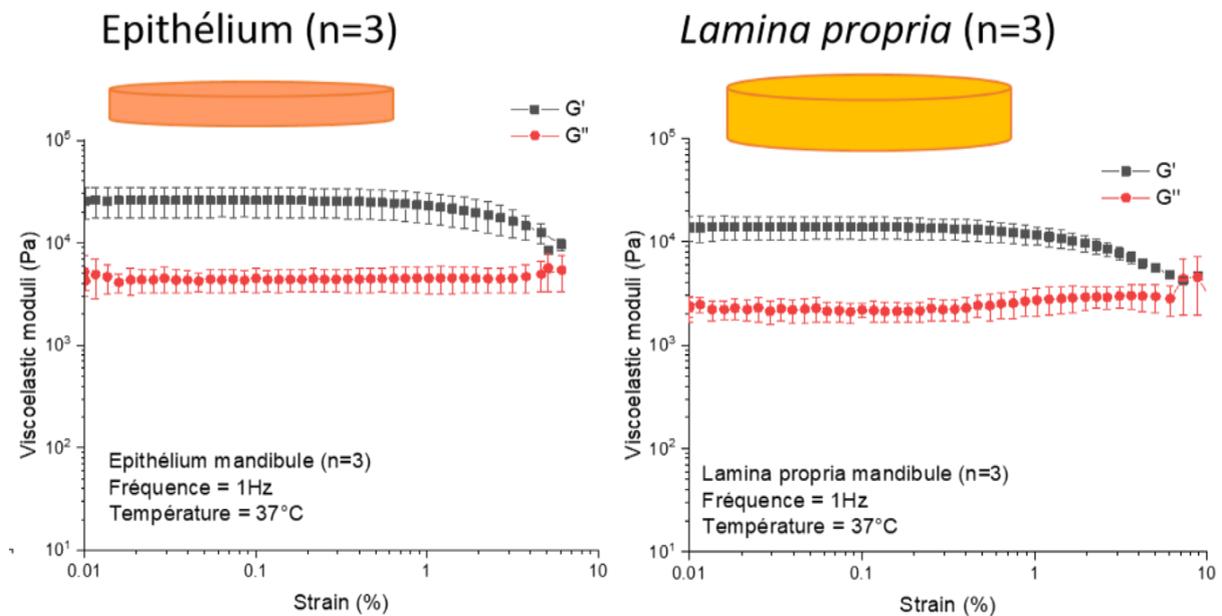


Figure 63: Influence de la couche constitutive des mandibules sur l'évolution des modules G' et G'' au cours d'un balayage en déformation

Si l'*épithélium* se caractérise par un module G' de l'ordre de $2,5 \cdot 10^4$ Pa dans la gamme de déformation [0.01-0.5%], le module G' de la *lamina propria* de l'ordre de $1,5 \cdot 10^4$ Pa pour les biopsies mandibulaires est très proche de celui déterminé pour la biopsie mandibulaire entière. Les modules de perte suivent une évolution similaire.

Par analogie avec l'épiderme de la peau, la rigidité de l'*épithélium* muqueux résulte en majeure partie des liaisons intercellulaires des cornéocytes, les desmosomes [199]. Comparativement à la *lamina propria*, l'*épithélium* possède une densité cellulaire plus élevée.

L'empilement de ces nombreuses cellules confère ainsi une meilleure tenue mécanique à l'épithélium et donc une augmentation du module G' . Les épithélia sont principalement riches en lipides, empêchant la pénétration de l'eau. Ainsi cette couche est plus rigide que la lamina propria. Nous observons enfin que le comportement viscoélastique des échantillons de lambeau entier est régi principalement par la lamina propria.

Cette contribution majoritaire de la lamina propria sur la valeur des modules caractéristiques des biopsies est cohérente avec le volume de cette couche dans la muqueuse buccale.

- Influence de la température

Afin de compléter les résultats obtenus par analyse calorimétrique, nous avons souhaité étudier l'évolution du comportement mécanique des biopsies avec la température, même si cette exploration nécessite de quitter les conditions physiologiques. Pour cela nous avons déterminé les modules viscoélastiques des lambeaux mandibulaires et maxillaires lors de chauffes successives en température entre 35 et 85°C à 1°C/min, en mode cisaillement, pour une fréquence de 1Hz et une déformation de 0.1% (Figure 64).

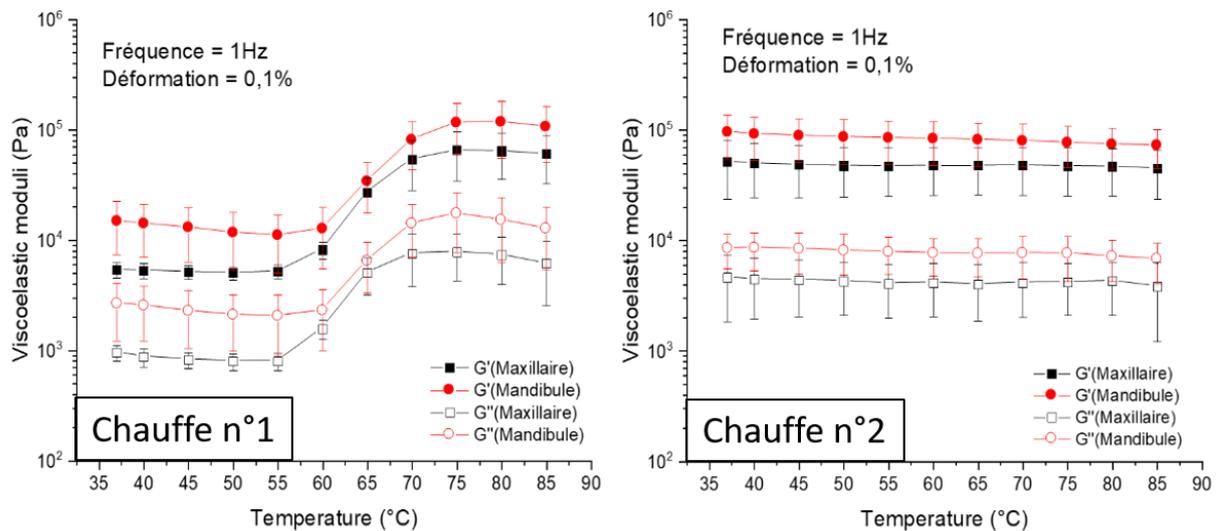


Figure 64: Influence de la température sur l'évolution des modules G' et G'' des muqueuses mandibulaires et maxillaires

Nous observons une évolution similaire des modules conservatifs des lambeaux maxillaires et mandibulaires : quasiment stables entre 35 et 55°C, G' et G'' augmentent à partir de 55°C, puis se stabilisent de 75°C à 85°C.

Lors de la seconde rampe en température, nous retrouvons des valeurs de modules G' constantes et identiques aux valeurs observées en fin de première rampe.

Ces données thermomécaniques couplées aux analyses ACD confirment le caractère irréversible de la dénaturation des protéines des biopsies de muqueuses buccales en fonction de la température. La dénaturation thermique du collagène contenu au sein des biopsies maxillaires et mandibulaires se manifeste par une variation du comportement mécanique entre 55 et 70°C.

Lors de la dénaturation de la structure collagénique, les fibres vont subir de fortes contractions provoquant la compaction des fibres. La contraction couplée à la perte d'eau peut par conséquent accroître le durcissement du tissu muqueux pendant la chauffe et expliquer l'augmentation des modules [200].

Afin de s'affranchir de la réponse de l'épithélium, des tests en cisaillement sont réalisés sur des échantillons de *lamina propria* mandibulaires (n=3) lors de deux rampes successives entre 5 et 85°C à 1°C/min, à fréquence de 1Hz et à 0,1% de déformation. La Figure 65 présente l'évolution du module G' en fonction de la température.

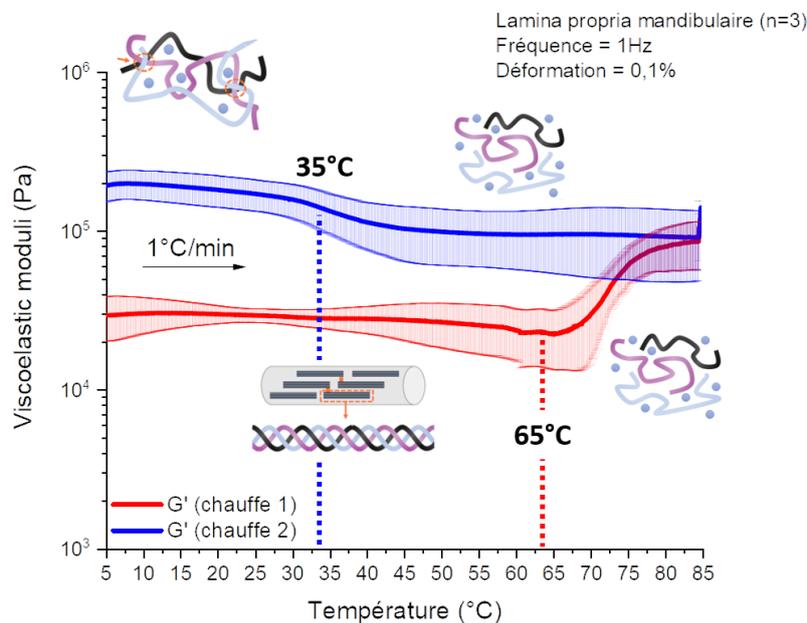


Figure 65: Balayage en température d'un échantillon de lamina propria mandibulaire (chauffe n° 1 et chauffe n°2)

Nous avons mis en évidence le phénomène caractéristique de l'effondrement de la triple hélice de collagène entre 60 et 85°C. Après dénaturation, le module G' augmente de manière irréversible comme observé sur la Figure 64.

Lors de la seconde chauffe, il est possible d'observer un second phénomène qui n'avait pas été possible de détecter sur le lambeau entier (Figure 65), correspondant à une diminution du module d'un facteur 2 à partir de 35°C. Cet événement pourrait correspondre à la manifestation mécanique de la transition vitreuse de la phase dénaturée du collagène, la gélatine [201], avec un plateau vitreux au-dessous de 35°C et un plateau caoutchoutique au-dessus de cette température de transition vitreuse.

III.A.4.2 Définition des marqueurs mécaniques retenus

A l'issue des résultats de cette étude de faisabilité sur la muqueuse porcine, nous proposons de retenir les marqueurs mécaniques suivants (Tableau 21) pour l'étude clinique.

Afin de garantir l'intégrité des échantillons de muqueuses buccales humaines durant les essais, nous appliquerons les conditions suivantes :

- Fréquence de sollicitation : 1Hz
- Température : 37°C
- Gamme de déformation : [0,1-3%]

Tableau 21: Indicateurs mécaniques spécifiques de la muqueuse buccale

Indicateurs mécaniques	Variable quantitative continue
Module conservatif	Module élastique G' (Pa)
Module de perte	Module visqueux G'' (Pa)
Déformation critique	déformation Υ_c (%)

III.B Caractérisation physico-chimique de la peau de souris et comparaison des marqueurs associés en condition physiopathologique

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe « Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux » (PPB) du CIRIMAT, des échantillons de peau de souris ont été confiés pour analyses physico-chimiques.

Il s'agira dans un premier temps de valider la pertinence du protocole expérimental mis en place et d'identifier des marqueurs du derme sain. Dans un second temps, nous vérifierons si ces biomarqueurs sont modifiés avec la pathologie (modèle de diabète).

Ces analyses pourront nous renseigner en amont sur l'impact des pathologies sur le comportement structural et organisationnel des échantillons tissulaires.

III.B.1. Signature vibrationnelle des explants de peaux de souris

La Figure 66 présente les spectres moyennés des dermes contrôles « WT » et diabétiques « db/db » dans la région spectrale [3800-1000 cm^{-1}]. Les bandes du derme « WT » sont similaires à celles décrites dans la littérature pour le derme humain et correspond aux indexations précédemment décrits dans la thèse de R.Tang [1].

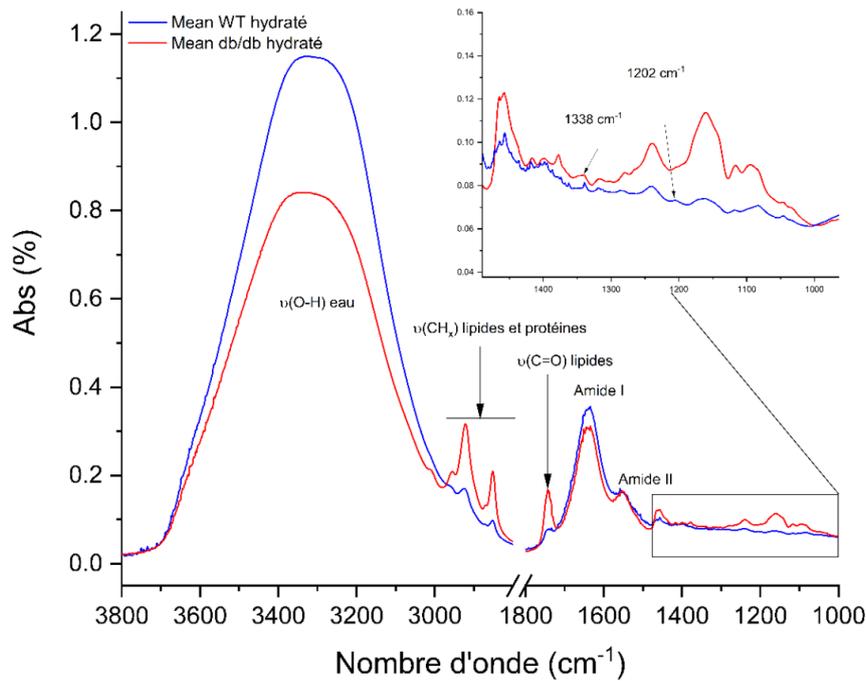


Figure 66: Profils IRTF moyennés des explants de peaux de souris hydratés, dans la zone [3800-1000 cm^{-1}]

Dans la zone caractéristique des vibrations d'élongation $\nu(\text{O-H})$ de l'eau libre (amide A) et des modes d'élongation des groupes $\nu(\text{CH})_x$ des lipides et des protéines (zone [3800-2800 cm^{-1}]), nous observons d'une part une diminution de l'intensité de l'amide A pour le derme des souris diabétiques, mettant en évidence une diminution de leur degré d'hydratation. Il est à noter d'autre part une augmentation de l'intensité des bandes de la zone des méthyles et méthylènes au sein des tissus diabétiques.

Dans la zone [1800-1720 cm^{-1}], nous observons un intense pic correspondant à l'absorption spécifique d'élongation des groupes carbonyle des lipides estérifiés ($\nu(\text{C=O})$). Cette bande permet de confirmer l'augmentation de la phase lipidique chez les individus diabétiques.

L'agrandissement réalisé sur la zone [1500-1000 cm^{-1}] met en évidence les modes d'absorption du collagène (1338, 1280, 1236 et 1202 cm^{-1}), aussi bien pour les échantillons contrôles que pour les échantillons diabétiques.

La Figure 67 présente la réponse spectrale des explants de peaux de souris déshydratés dans la zone [3800-2600 cm^{-1}] ainsi que l'indicateur « lipides/protéines » chez les souris saines et diabétiques. On confirme ainsi une augmentation significative de cet indicateur chez les souris diabétiques.

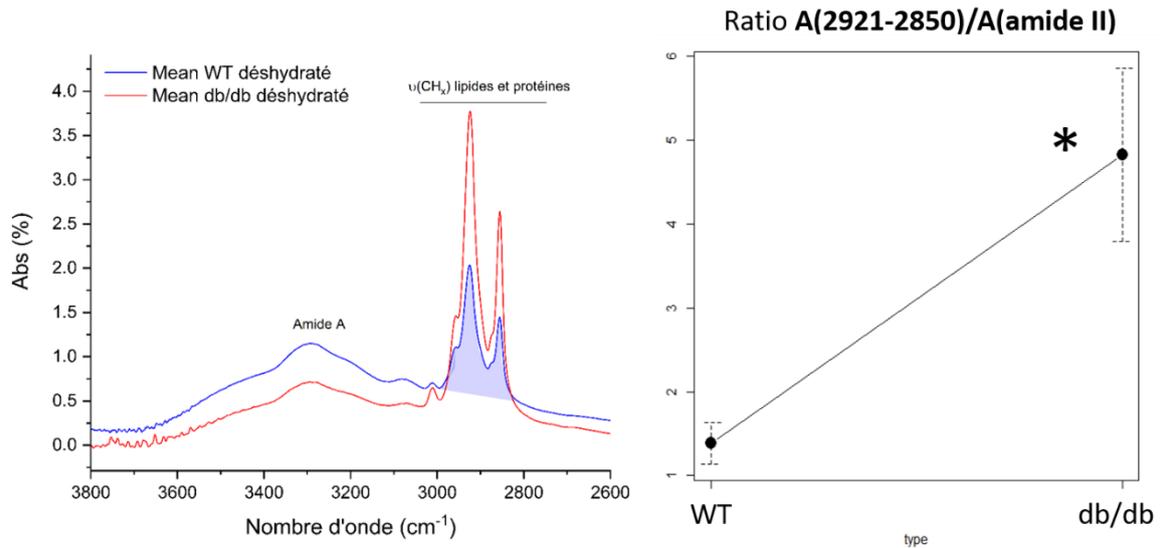


Figure 67: Profils IRTF moyennés des explants de peaux de souris déshydratés la zone [4000-2500 cm^{-1}] et évolution de l'indicateur « lipides /protéines »

La Figure 68 présente l'évolution de la bande 1745 cm^{-1} avec le diabète. Nous observons une augmentation significative de l'indicateur « lipides estérifiés/protéines » chez les souris db/db. Cette augmentation corrobore l'évolution de l'indicateur « lipides/protéines » de la zone [3800-2600 cm^{-1}] (Figure 67).

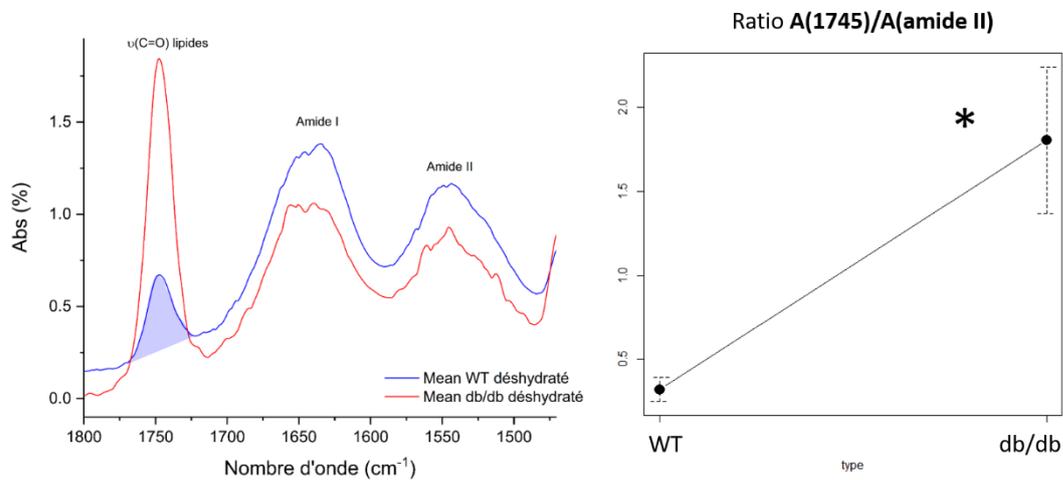


Figure 68: Profils IRTF moyennés des explants de peaux de souris déshydratés dans la zone [1800-1450 cm^{-1}] et évolution de l'indicateur « lipides estérifiés /protéines »

La Figure 69 montre une tendance à la diminution de la « fraction collagène » pour les échantillons diabétiques.

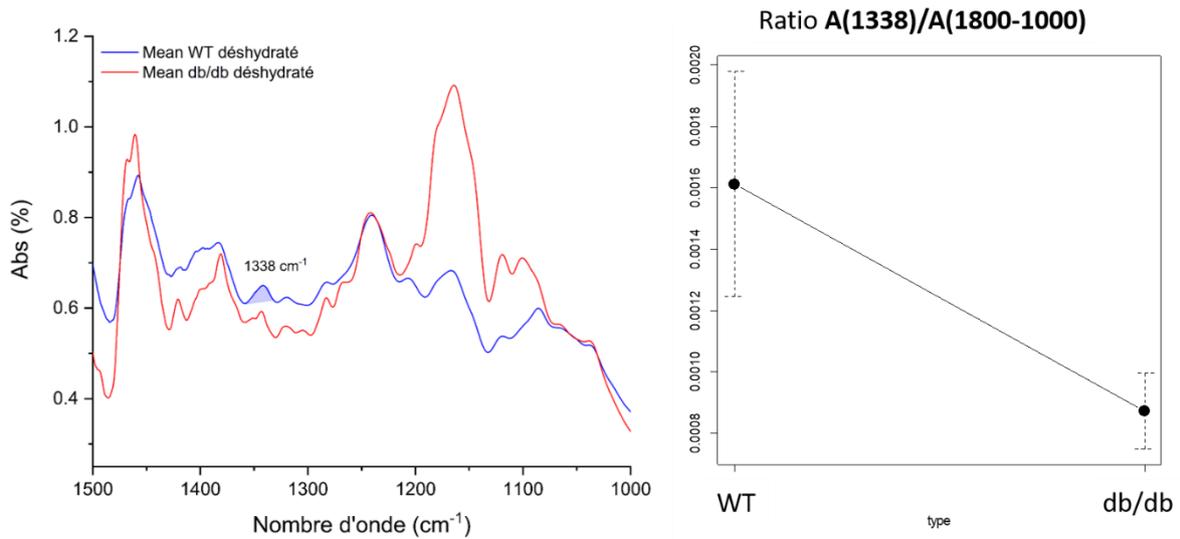


Figure 69: Profils IRTF moyennés des explants de peaux de souris déshydratés dans la zone [1500-1000 cm^{-1}] et « fraction collagène »

Ces analyses, préliminaires, mettent en évidence la pertinence de ces marqueurs vibrationnels pour détecter des modifications moléculaires chez les individus diabétiques, induites par une diminution de l'hydratation, une diminution de la phase collagénique et une augmentation de la composante lipidique.

III.B.2. Signature thermique des explants de peaux de souris

Les échantillons sont soumis au programme de température suivant sous atmosphère inerte (hélium) :

- Refroidissement n°1 : de 20 à -50°C à $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$
- Chauffe n°1 : de -50 à 85°C à $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$

III.B.2.1 Organisation hydrique

Sur le thermogramme ACD enregistré lors de la première chauffe dans la zone [-30 ; 30°C], (Figure 70) le pic endothermique associé à la fusion de l'eau cristallisée est mis en évidence pour les différents échantillons.

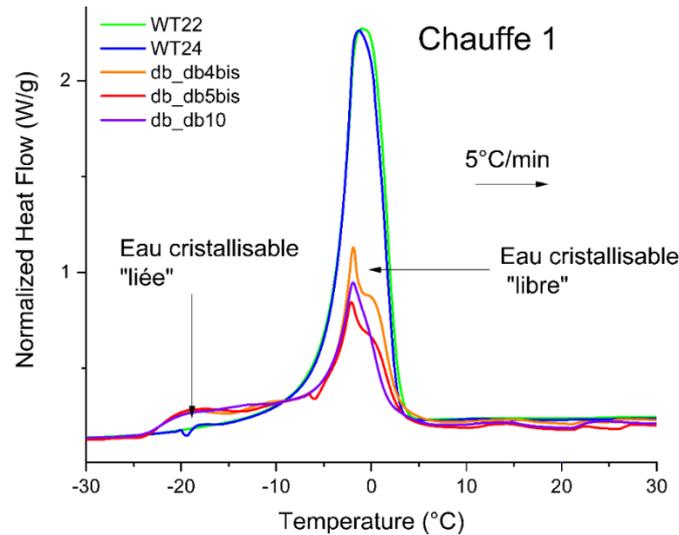


Figure 70: Thermogrammes ACD des explants de peau de souris entre -30 et 30 °C enregistré lors de la chauffe n°1.

Il est à noter une importante diminution de l'intensité de l'enthalpie de fusion de l'eau cristallisable pour les échantillons db/db. Les mesures thermogravimétriques complémentaires permettent de déterminer la répartition hydrique des explants de peau de souris.

Le Tableau 22 présente la quantité d'eau totale, libre et liée au sein des échantillons WT et db/db.

Tableau 22: Organisation hydriques des explants de peau de souris

Moyenne	% Eau totale	% Eau libre	% Eau liée
Echantillons contrôles [n=2] (WT)	61,8	40,5	21,3
Echantillons diabétiques [n=3] (db/db)	22,3	12,5	9,77

Les quantités d'eau totale, libre et liée diminuent drastiquement pour les échantillons diabétiques, ce qui corrobore les résultats obtenus en IRTF-ATR.

La diminution de l'eau libre peut s'expliquer de par la réduction de la teneur en protéine (collagène), observée en IRTF-ATR tandis que la présence d'eau cristallisable « liée » semble être induite par l'augmentation des sites hydrophiles des lipides constitutifs des tissus diabétiques.

Enfin, nous remarquons l'apparition d'un phénomène endothermique entre -25 et -10°C pour les échantillons db/db. Ce pic reproductible n'est pas observé pour les échantillons WT. Une récente étude sur la distribution des états de l'eau dans des hydrogels a également permis de mettre en lumière ce type de phénomène assimilé au point de fusion d'une eau cristallisable « liée » [202].

Schématiquement représenté sur la Figure 71, cette eau congelable « liée » interagit avec le squelette protéique généralement par l'intermédiaire d'autres molécules d'eau. Contrairement à l'eau liée, ces interactions ne sont pas assez fortes pour maintenir cette eau non congelée.

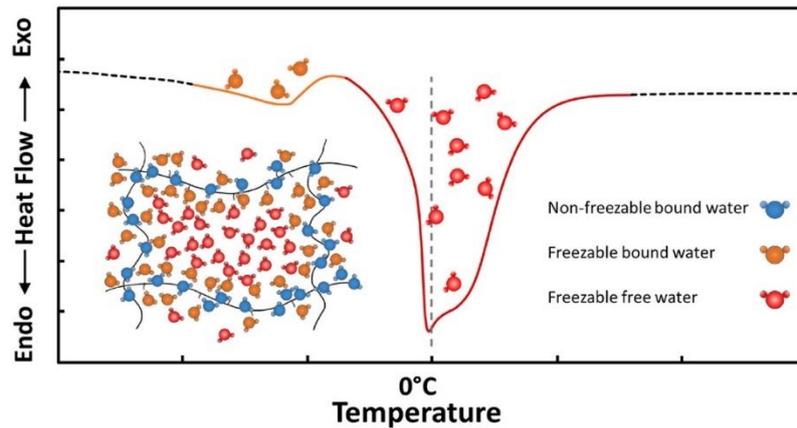


Figure 71: Schématisation de la présence d'eau congelable « liée » sur un thermogramme ACD

III.B.2.2 Stabilité thermique du collagène

L'agrandissement des thermogrammes ACD correspondant à la première montée en température pour les échantillons d'explants de peaux de souris hydratées dans la zone [45-80°C] est reportée en Figure 72.

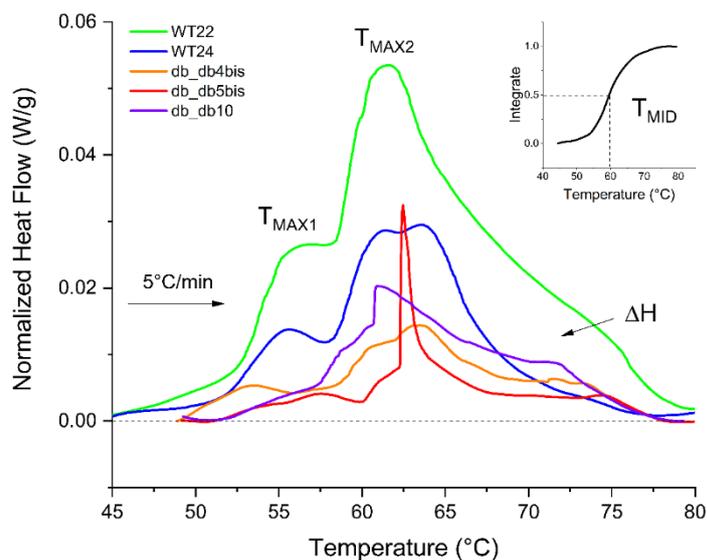


Figure 72: Thermogrammes ACD des explants de peau de souris dans la zone de dénaturation du collagène durant la première montée en température

Comme observé sur des échantillons de peaux de rat [140], le thermogramme de dénaturation du collagène est composé d'un pic principal encadré par deux épaulements, signe de l'hétérogénéité de la stabilité thermique des fibres de collagène.

Ces thermogrammes permettent de définir les températures T_{MAX1} et T_{MAX2} associées au collagène possédant respectivement des réticulations labiles et stables des différents domaines. Les températures T_{MID} ont également été identifiées afin d'évaluer la stabilité thermique de l'ensemble du thermogramme. Nous avons aussi déterminé $\Delta T_{1/2}$ (°C) qui représente la largeur

totale à mi-hauteur du pic principal et donne une mesure de l'étendue de la distribution de la stabilité thermique.

Les valeurs moyennes de ces différentes températures de dénaturation pour les explants de peau de souris « WT » et « db/db » sont indiquées dans le Tableau 23.

Tableau 23: Paramètres de dénaturation thermiques des explants de peaux de souris

Moyenne ± SD	Tmax 1 (°C)	Tmax 2 (°C)	Tmid (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C) pic 2	ΔH_{tot} (J/gsec)
Echantillons contrôles [n=2] (WT)	55,7	62,6	62,4	9,2	13,9
Echantillons diabétiques [n=3] (db/db)	55,4	62,1	63,8	5,90	2,66

La position des températures ne se semble pas être modifiée pour les échantillons diabétiques. Cependant, une diminution de l'intensité des pics associées aux Tmax1 et Tmax2 et plus généralement une diminution de l'intensité de l'enthalpie de dénaturation ΔH_{tot} est notée pour les peaux de souris diabétiques. La diminution de cette enthalpie au sein des tissus diabétiques confirme la réduction de la teneur en collagène obtenue par IRTF-ATR. La diminution de $\Delta T_{1/2}$ chez les individus diabétiques indique que la transition est hautement coopérative. La diminution de $\Delta T_{1/2}$ semble être caractéristique d'une stabilité accrue du réseau collagénique.

Ces résultats apparaissent cohérents avec les analyses montrant que les sujets diabétiques présentent des niveaux élevés de métalloprotéases (MMP) et une expression accrue de la lysyl oxydase (LOX) entraînant simultanément la fragmentation et une réticulation du collagène [203].

III.B.3. Signature viscoélastique des explants de peaux de souris

Pour évaluer le comportement mécanique des explants de peaux de souris, nous avons réalisé des analyses mécaniques dynamiques.

La Figure 73 présente l'évolution des modules en cisaillement G' et G'' , effectués pour des amplitudes comprises entre 0,01 et 4% aux fréquences respectives de 0,1 et 1Hz.

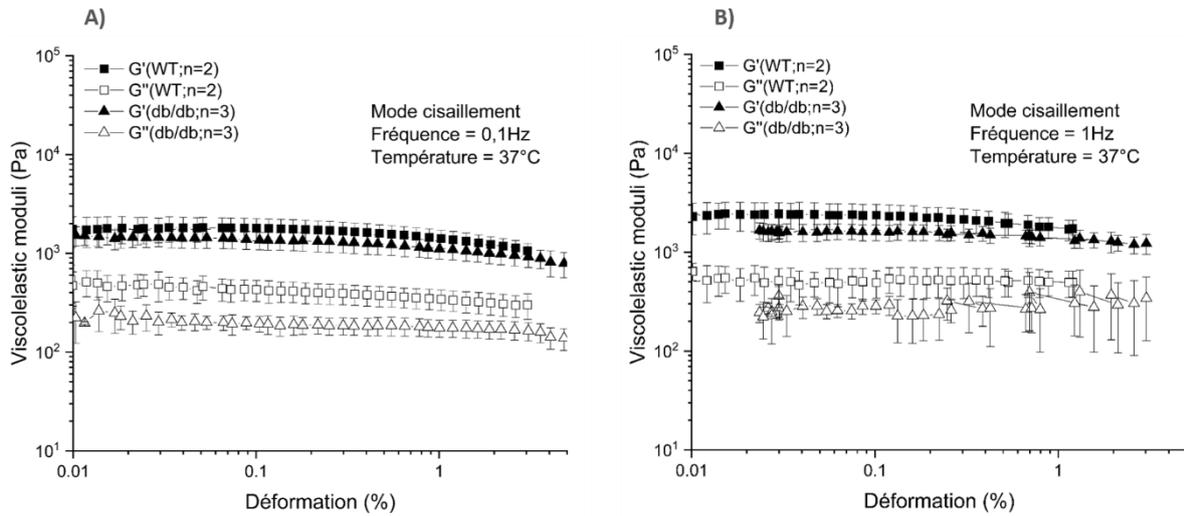


Figure 73: Balayage en déformation de cisaillement des échantillons d'explants de peaux de souris à 0,1 et 1 Hz et à 37°C

Comme observé pour les tissus buccaux porcins, les modules G' sont supérieurs aux modules G'' quelle que soit l'amplitude de déformation, reflétant le caractère « solide » de la peau.

Le Tableau 24 présente la valeur des modules G' relevées à 0,1% de déformation et moyennées pour chaque fréquence.

Tableau 24: Modules G' à 0,1% de déformation pour les échantillons d'explants de peaux de souris

G' (kPa) @ 0,1% (Moyenne \pm SD)	@0,1 Hz	@1 Hz
CR57Bl/6	1,8 \pm 0,45	2,4 \pm 0,68
db/db	1,3 \pm 0,27	1,6 \pm 0,28

Ces premières données montrent que les modules viscoélastiques G' des peaux de souris diabétiques sont plus faibles que ceux des peaux de souris contrôles.

Cette diminution de la rigidité en cisaillement semble en accord avec la tendance à la diminution de la fraction collagénique pour les souris diabétiques.

Pour une fréquence de 1 Hz, il est à noter une réponse assez instable pour le module de perte peaux de souris diabétiques. Il semblerait que la fréquence de sollicitation soit trop élevée pour mesurer correctement ce module pour les échantillons plus pauvres en collagène.

III.C Récapitulatif

L'étude de faisabilité sur la muqueuse de porc a permis de confirmer la capacité des techniques thermiques, vibrationnelles et mécaniques pour obtenir des réponses reproductibles et pour extraire des marqueurs associés à l'organisation hydrique, la structure physique et la composition de biopsies de faible dimension.

En particulier, la spectrométrie IRTF en mode ATR a mis en évidence l'importante différence de composition des *épithélia* et *lamina propria* porcins.

L'analyse thermique a révélé une influence de la localisation (mandibule versus maxillaire) tant au niveau de l'organisation hydrique que de la structure physique du collagène, ce qui est corroboré au niveau des propriétés viscoélastiques.

Enfin, nous avons pu transposer avec succès ce protocole à un autre type de tissu épithélio-conjonctif (la peau de souris), ce qui nous a permis dans une étude préliminaire de mettre en évidence l'évolution des réponses thermiques, vibrationnelles et mécaniques pour les souris diabétiques.

Ce protocole de caractérisation biophysique sera exploité pour caractériser la muqueuse buccale humaine dans le cadre de l'étude clinique qui fait l'objet du prochain chapitre.

IV. Etude clinique

Ce chapitre sera consacré à la description de la distribution des marqueurs vibrationnels, thermiques et mécaniques de la muqueuse buccale à partir de spectrogrammes obtenus grâce aux analyses biophysiques (IRTF/ACD/AMD), réalisées chez deux groupes de patients d'âges différents.

L'objectif principal de cette étude est d'étudier le lien entre les variables catégorielles, notamment les classes d'âges (20-40 ou 70-90 ans) et les marqueurs physico-chimiques préalablement déterminés dans l'étude de faisabilité (chapitre III).

Les objectifs secondaires consistent à étudier le lien entre les données cliniques locales, générales, les traitements et les marqueurs physico-chimiques.

L'étude clinique entre dans le cadre de catégorie 2 c'est-à-dire à risques et contraintes minimales. Elle a fait l'objet d'un contrat spécifique entre le CHU de Toulouse (DRDI Direction de la Recherche et de l'Innovation) et l'Université Paul Sabatier. La méthodologie et la gestion des données sont validées par l'Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche (USMR), et sont mises en place au CHU de Toulouse et au CIRIMAT (Equipe PhyPol). Sous la responsabilité du promoteur (CHU de Toulouse), cette recherche est portée par un investigateur coordonnateur principal qui est compétent pour le prélèvement et la gestion des échantillons.

Les démarches réglementaires pour les recherches de catégorie 2 sont :

- Souscription à une assurance par le promoteur (CHU de Toulouse)
- Avis du comité de protection des personnes (CPP)
- Envoi du résumé et de l'avis du CPP à l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé)
- Engagement de conformité à la méthodologie de référence (MR) 001 auprès de la CNIL (Commission nationale de l'informatique et des libertés).

Ce protocole (n°RC31/19/0423/MMOBUCC) a été soumis au CPP et a reçu l'avis favorable du CPP le 10 janvier 2020. Cet avis favorable est obligatoire pour débiter la phase de recrutement, d'inclusion et de prélèvement. Conformément au décret du 16 novembre 2016, la répartition entre les CPP se fait par tirage au sort sous la responsabilité de la Commission Nationale des recherches impliquant la personne humaine.

Avant tout prélèvement, une note d'information et un formulaire de consentement est remis au participant et/ou à son représentant légal. Le consentement de chaque patient est signé lors de l'inclusion. Les données cliniques sont collectées sur un cahier d'observation CRF (Case Report Form) à partir du dossier médical du patient.

Parmi les données recueillies, on retrouve les **caractéristiques cliniques locales** évaluées grâce à des indices spécifiques sur le statut oral à savoir :

- L'indice d'hygiène OHI (Oral Hygien Index) permettant d'évaluer la quantité de plaque sur les surfaces dentaires [204].

- L'indice de saignement SBI (Sulcus Bleeding Index), étant l'indicateur du degré d'inflammation gingivale (qui se manifeste par un saignement gingival) [205]. La plaque constitue un facteur de risque de gingivite et lorsqu'elle est associée à un saignement gingival, on parle de gingivite clinique.

Lorsque l'OHI est supérieur à 0, le patient est sujet à des risques inflammatoires. Afin de diagnostiquer une gingivite, il est nécessaire de coupler l'OHI au SBI. Si ces deux indices sont supérieurs à 0, le patient présente une gingivite.

- L'indice OHAT (Oral Health Assessment Tool), qui représente l'échelle d'évaluation de l'état de santé de santé oral global du patient. Cette échelle, utilisée quel que soit le niveau cognitif des patients [206], considère aussi bien le statut muqueux, dentaire, prothétique que l'hygiène buccale et la douleur. En effet, plusieurs items sont pondérés de 0 à 2. Le coefficient 0 indique un état buccal sain, le coefficient 1 indique un état buccal modifié et le coefficient 2 indique un état buccal pathologique. Le score OHAT représente donc la somme des scores de l'ensemble des items. Si le score OHAT est compris entre 0 et 4, la bouche est considérée comme saine. Si le score OHAT est compris entre 4 et 8, la bouche se dégrade, il existe des points de fragilité, Si le score OHAT est compris entre 8 et 12 la bouche est dans un état préoccupant et si le score OHAT est supérieur à 12, la bouche est dans un état pathologique.

Dans le cadre de notre étude, et afin d'obtenir une classification homogène, nous avons regroupé les patients en deux groupes : un état de santé oral satisfaisant avec un score OHAT compris entre 0 et 4 et ceux présentant un état de santé oral fragilisé voire pathologique avec un score OHAT supérieur à 4

- La sécheresse buccale est repérée à l'aide d'un des items de la grille OHAT (Item Salive à scorer de 0 à 2). Si le score est égal à 0, le flux salivaire est considéré comme correct. La sécheresse buccale est définie si ce score est supérieur à 0.

Les **données cliniques générales** ainsi que les traitements suivis associés ont également été recueillis par interrogatoire ou à partir des données du dossier médical des patients.

Parmi la liste des pathologies présentées dans le tableau de l'indice de comorbidité de Charlson, nous avons retenu trois catégories de pathologies qui peuvent affecter la muqueuse buccale à savoir les maladies cardiovasculaires, les troubles psycho-cognitifs et le diabète traité. Il est à noter que ces patients peuvent cumuler ces trois types de maladies.

Nous avons fait de même pour les traitements médicamenteux pouvant présenter une iatrogénie pour la muqueuse buccale, à savoir : les traitements des pathologies cardiovasculaires, les anticoagulants et les traitements des affections psycho-cognitives.

IV.A Description de la populationIV.A.1. Données cliniques locales et générales

Nous présentons sur les Tableau 25 et Tableau 26 la description de la population étudiée en termes de données sociodémographiques, cliniques générales et locales.

Tableau 25: *Descriptif de la population étudiée en termes de données*

Classe d'âge	Effectif n=38 (%)	Moyenne d'âge ± écartype	Nombre de dents	Moyenne ± écartype
<i>Jeunes</i>	5 (13%)	27 ± 5	<i>Jeunes</i>	30 ± 2
<i>Agés</i>	33 (87%)	82 ± 5	<i>Agés</i>	19 ± 8
Sous-groupe patients âgés	Effectif n=33 (%)		Moyenne d'âge ± écartype	
<i>[70-79 ans]</i>	11 (33%)		76 ± 2	
<i>[80-90 ans]</i>	22 (67%)		85 ± 3	
Genre	Patients jeunes [20-40 ans] n=5		Patients âgés [70-90 ans] n=33	
<i>Féminin</i>	1 (20%)		19 (58%)	
<i>Masculin</i>	4 (80%)		14 (42%)	
Localisation du prélèvement	Patients jeunes [20-40 ans] n=5		Patients âgés [70-90 ans] n=33	
<i>Maxillaire</i>	4 (80%)		14 (42%)	
<i>Mandibule</i>	1 (20%)		19 (58%)	
Prélèvement salivaire	Patients jeunes [20-40 ans] n=5		Patients âgés [70-90 ans] n=33	
<i>oui</i>	5 (100%)		26 (78%)	
Score OHAT	Patients jeunes [20-40 ans] n=5		Patients âgés [70-90 ans] n=33	
<i>Sain</i>	4 (80%)		10 (30%)	
<i>Dégradé</i>	1 (20%)		23 (70%)	
*Signes cliniques locaux	Patients jeunes [20-40 ans] n=5		Patients âgés [70-90 ans] n=33	
<i>Facteurs de risques inflammatoires</i>	1 (20%)		5 (15%)	
<i>Gingivite</i>	1 (20%)		18 (55%)	
<i>Aucun signe clinique local</i>	3 (60%)		10 (30%)	
<i>Sécheresse buccale</i>	1 (20%)		13 (39%)	

Tableau 26: Descriptif de la population étudiée en termes de données (suite)

*Pathologies	Patients jeunes [20-40 ans] n=5	Patients âgés [70-90 ans] n=33
<i>Troubles psychocognitifs</i>	1 (20%)	25 (75%)
**Diabète	0 (0%)	6 (18%)
<i>Maladies cardiovasculaires</i>	0 (0%)	29 (87%)
<i>Sans pathologie chronique</i>	4 (80%)	1 (3%)
* Traitements médicamenteux	Patients jeunes [20-40 ans] n=5	Patients âgés [70-90 ans] n=33
<i>Psychotropes</i>	1 (20%)	27 (81%)
<i>Anticoagulants</i>	0 (0%)	17 (51%)
<i>Traitements Maladies cardiovasculaires</i>	0 (0%)	20 (30%)
<i>Aucune polymédication</i>	4 (80%)	2 (6%)

*Un patient peut présenter plusieurs pathologies locales et/ou générales et prendre plusieurs traitements médicamenteux.

**Diabète traité et équilibré.

La salive et la muqueuse buccale sont cliniquement corrélées. Le protocole MMOBUC prévoyait, en plus du prélèvement de muqueuse, le prélèvement d'un échantillon salivaire lorsqu'il était possible. En effet, pour certains patients, le prélèvement salivaire était impossible à réaliser. Cette indication a été notée dans le cahier d'observations du patient concerné. Cette donnée n'a pas été considérée comme un critère d'exclusion.

IV.A.2. Lien entre les données sociodémographiques, cliniques générales et locales

Avant de nous intéresser à la distribution des marqueurs biophysiques, nous avons vérifié s'il existait des liens entre les données sociodémographiques et les cliniques locales ou les données cliniques générales (de l'Annexe 4 à l'Annexe 13).

IV.A.2.1 Lien entre les indices et signes locaux et la classe d'âge

Les analyses univariées ne décèlent aucun lien entre l'âge et les indices OHI/SBI (Annexe 4) ou encore entre l'âge et les signes cliniques locaux (tels que la gingivite et les facteurs de risques inflammatoires) (Annexe 5).

IV.A.2.2 Lien entre l'état de santé buccal et la classe d'âge

Nous observons une augmentation significative ($p=0.01786$) du score OHAT chez les patients âgés (Figure 74) (voir distribution, test d'homogénéité des variances et test de normalité pour le score OHAT en fonction des classes d'âge Annexe 6).

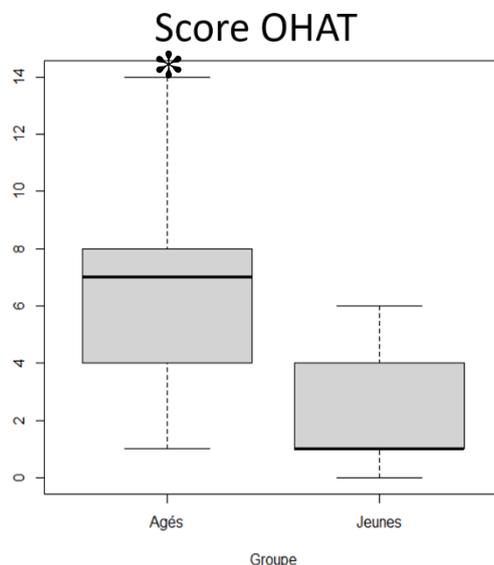


Figure 74: Boîtes de dispersion du score OHAT en fonction de la classe d'âge

Cette évolution est corroborée par le diagramme de dispersion du score OHAT en fonction de l'âge (Annexe 7) montrant une corrélation significativement supérieure à 0, signe d'une **dégradation de l'état de santé bucco-dentaire chez les patients âgés** [207].

IV.A.2.3 Lien entre les pathologies générales et l'âge

L'état de santé se dégrade avec l'âge. En effet, 87% de la population âgée (contre 20% pour les patients jeunes) sont poly-pathologiques. Les maladies cardiovasculaires, les troubles psycho-cognitifs et le diabète traité sont les pathologies les plus représentatives de la population étudiée et sont couramment rencontrées en gériatrie.

Le Tableau 27 démontre la dépendance entre les pathologies et l'âge via les tests exacts de Fisher.

Tableau 27: Lien entre les pathologies générales et l'âge (Test exact de Fisher)

N=33+5	Variance (p-value)
Maladies cardiovasculaires	2.948e-12
Troubles psycho-cognitifs	0.0001999
Diabète	0.01386

Nous avons également vérifié la dépendance entre l'âge et les pathologies, **uniquement chez les patients âgés (n=33)** séparés entre deux groupes d'âge (70-80) et (80-90). Le Tableau 28 démontre un lien entre les troubles psycho-cognitifs et l'âge des patient âgés ($p=0,0166$).

Tableau 28: Lien entre les pathologies générales et l'âge (uniquement chez les patients âgés séparés entre deux groupes d'âge (Test exact de Fisher)

N=19+14	Variance (p-value)
Maladies cardiovasculaires	0.2054
Troubles psycho-cognitifs	0.0166
Diabète	0.3509

Les courbes de distribution, tests d'homogénéité des variances et tests de normalité pour les pathologies générales en fonction de l'âge sont présentées en Annexe 8.

IV.A.2.4 Lien entre les traitements médicamenteux et l'âge

La prise de traitements associés à ces pathologies est dépendante de l'âge (Tableau 29).

Tableau 29: Lien entre les traitement médicamenteux et l'âge (Test exact de Fisher)

N=33+5	Variance (p-value)
Traitements maladies cardiovasculaires	0.0000002381
Anticoagulants	0.000001132
Traitements troubles psycho-cognitifs	0.00005079

Nous avons également vérifié la dépendance entre l'âge et les traitements, **uniquement chez les patients âgés (n=33)** séparés entre deux groupes d'âge (70-80) et (80-90). Il est retrouvé uniquement une dépendance des traitements des troubles psycho-cognitifs avec l'âge des patients âgés ($p=0.03091$) (Tableau 30).

Tableau 30: Lien entre les traitements médicamenteux et l'âge (uniquement chez les patients âgés séparés entre deux groupes d'âge, Test exact de Fisher)

N=19+14	Variance (p-value)
Traitements maladies cardiovasculaires	0.2054
Anticoagulants	0.6131
Traitements troubles psycho-cognitifs	0.03091

Les courbes de distribution, tests d'homogénéité des variances et tests de normalité pour les traitements médicamenteux en fonction de l'âge sont présentées en Annexe 9.

IV.A.2.5 Lien entre l'état de santé buccal et les pathologies générales

Pour l'ensemble des deux populations, une augmentation significative du score OHAT est observée pour les patients atteints de maladies cardiovasculaires ($p=0.033544$) ainsi que chez les patients atteints de troubles psycho-cognitifs ($p=0.01467$) (Figure 75).

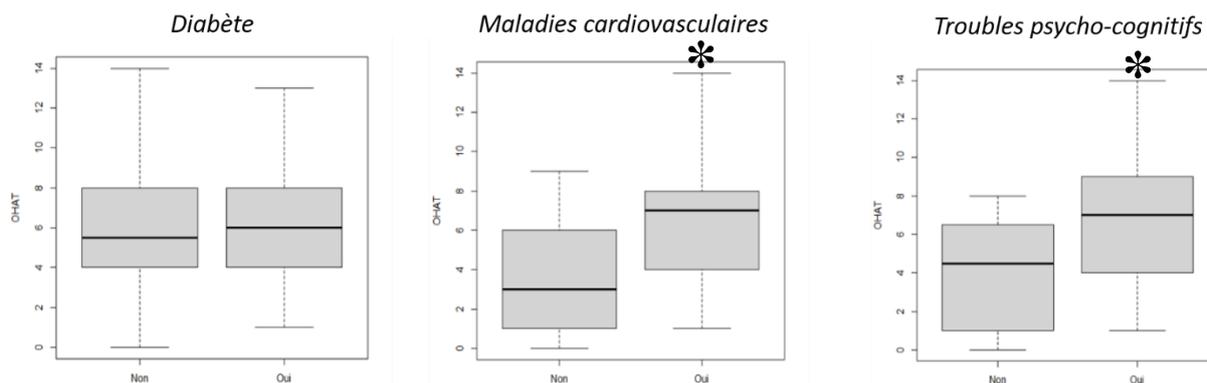


Figure 75: Boîtes dispersion du score OHAT en fonction des 3 types de pathologies

Il est important de préciser que les patients diabétiques ayant un bon contrôle glycémique, présentent une santé parodontale identique à celle des patients non diabétiques [208]. Ceci explique très probablement l'état de santé buccodentaire correct de la population diabétique étudiée. De plus, les diabétiques possèdent un meilleur accès à des prestations d'éducation thérapeutique ciblée sur leurs besoins et d'accompagnement intégré aux soins [209].

Pour l'ensemble des deux populations, les analyses (Annexe 10 et Annexe 11) ne mettent en évidence aucun lien entre les pathologies générales et les indices OHI/SBI. Pour les patients âgés séparés entre deux groupes d'âge, il n'existe pas de lien entre les pathologies et le score OHAT ou encore les indices OHI/SBI.

IV.A.2.6 Autres liens explorés entre données cliniques

Pour l'ensemble de la population (jeunes et âgés), le test exact de Fisher met en évidence une limite de significativité (**p=0.05942 SL**) entre la sécheresse buccale diagnostiquée et la prise de psychotropes (Annexe 12).

Enfin, aucune dépendance n'a été relevée entre la localisation du prélèvement et les gingivites et facteurs de risques inflammatoires (Annexe 13).

IV.A.2.7 Synthèse des données cliniques

Les données sociodémographiques et cliniques de la population étudiée dans le cadre de l'étude clinique sont représentatives de la population générale. En effet, nous retrouvons d'un côté des jeunes en bonne santé et de l'autre une population âgée poly-pathologique et poly-médiquée. De plus, le nombre de dents restantes chez les personnes de plus de 65 ans varie entre 12 et 17 [210], nombre de dents qui correspond bien à celui de la population âgée étudiée.

Il est à noter une dégradation de l'état de santé oral chez les patients présentant des troubles psycho-cognitifs et ceux atteints de maladies cardiovasculaires. C'est cohérent avec la littérature. L'état de santé bucco-dentaire est en lien avec l'état de santé général des patients [207].

IV.B Marqueurs thermiques

La technique de caractérisation ACD a montré sa capacité à déterminer l'état d'hydratation de la muqueuse ainsi que la stabilité du collagène par l'intermédiaire d'indicateurs thermiques pertinents identifiés lors de l'étude de faisabilité (chapitre III). L'ensemble de ces indicateurs a ainsi été compilé à partir des thermogrammes ACD réalisés sur les muqueuses humaines.

La distribution de ces marqueurs ainsi que les tests d'homogénéité des variances et de normalité sont présentés en annexe (Annexe 14 et Annexe 1315).

IV.B.1. Lien entre les marqueurs thermiques et la classe d'âge des patients

La Figure 76 présente à titre d'exemple les thermogrammes ACD d'un patient jeune et d'un patient âgé entre -20 et 85°C durant la première chauffe.

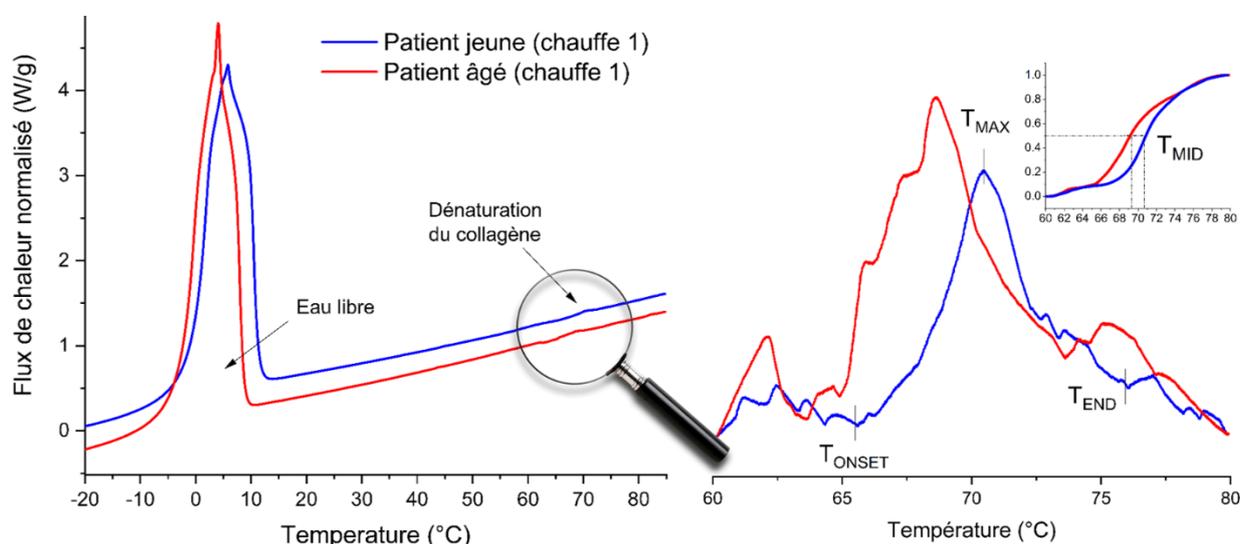


Figure 76 : Thermogrammes ACD des muqueuses buccales de patients jeunes et âgés

L'endotherme caractéristique de la fusion de l'eau cristallisable contenue dans l'échantillon muqueux est bien visible entre -20 et 20°C.

L'endotherme associé à la dénaturation du collagène est aussi détecté dans la zone [60-80°C]. Il est à noter un décalage de cet endotherme vers les basses températures ainsi que son élargissement pour le patient âgé.

IV.B.1.1 Organisation hydrique avec l'âge

Nous avons reporté sur la Figure 77 et la Figure 78, les pourcentages des différents types d'eau ainsi que le rapport eau liée/eau libre en fonction de la classe d'âge.

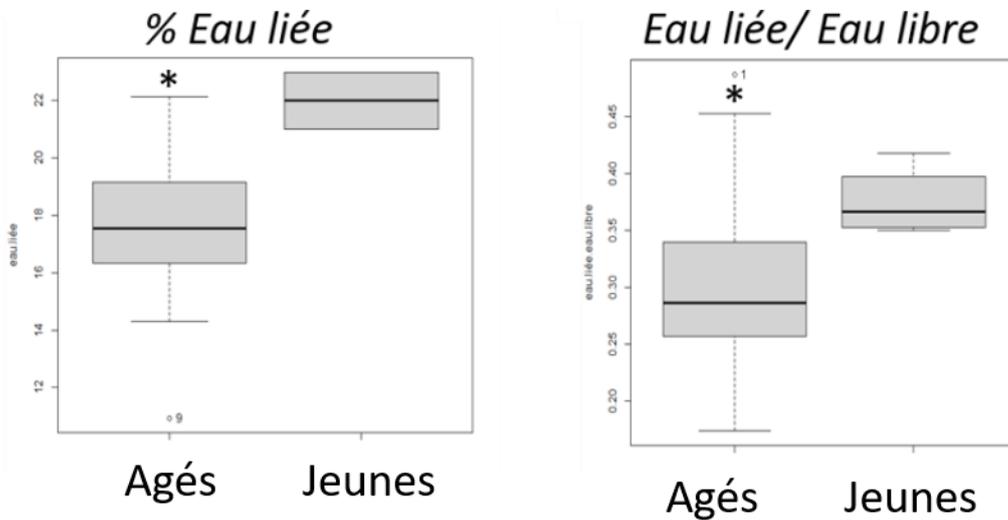


Figure 77: Boîtes de dispersion du pourcentage d'eau liée et du rapport en eau liée/eau libre en fonction de la classe d'âge

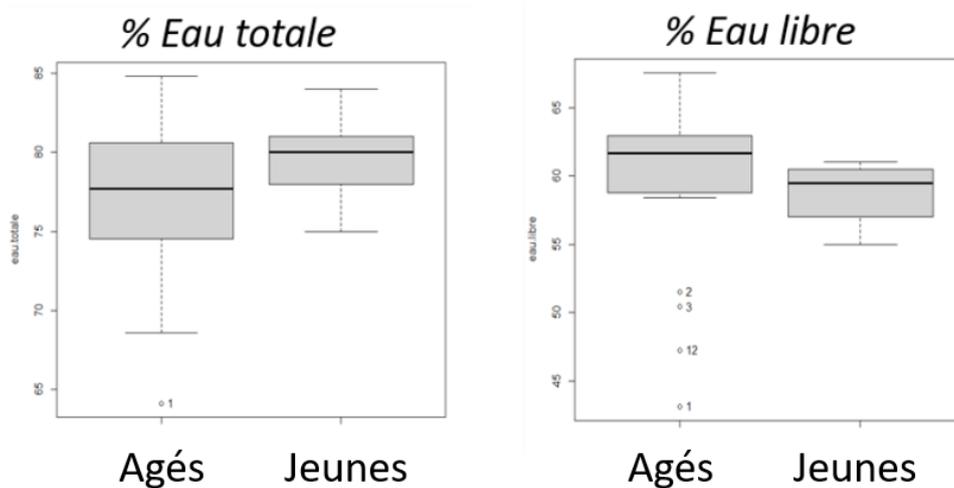


Figure 78: Boîtes de dispersion des pourcentages d'eau totale et d'eau libre en fonction de la classe d'âge

Il est à noter une diminution significative de l'eau liée avec l'âge ($p=0.01058$) qui entraîne très certainement la diminution du rapport eau liée/eau libre avec l'âge ($p=0.05443$ SL).

IV.B.1.2 Structure physique du collagène avec l'âge

La Figure 79 et la Figure 80 présentent les paramètres de dénaturation à savoir les températures T_{MAX} , T_{ONSET} , T_{MID} , T_{END} et l'enthalpie ΔH en fonction de la classe d'âge.

Les tests d'homogénéité des variances et test de normalité pour les données thermiques en fonction de l'âge sont présentés en Annexe 15.

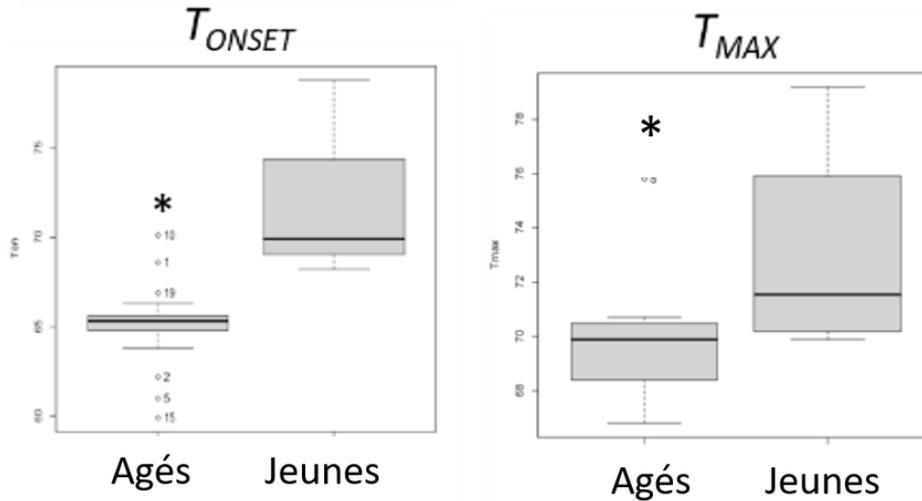


Figure 79: Boîtes de dispersion des paramètres de dénaturation du collagène (T_{ONSET} et T_{MAX}) en fonction de la classe d'âge

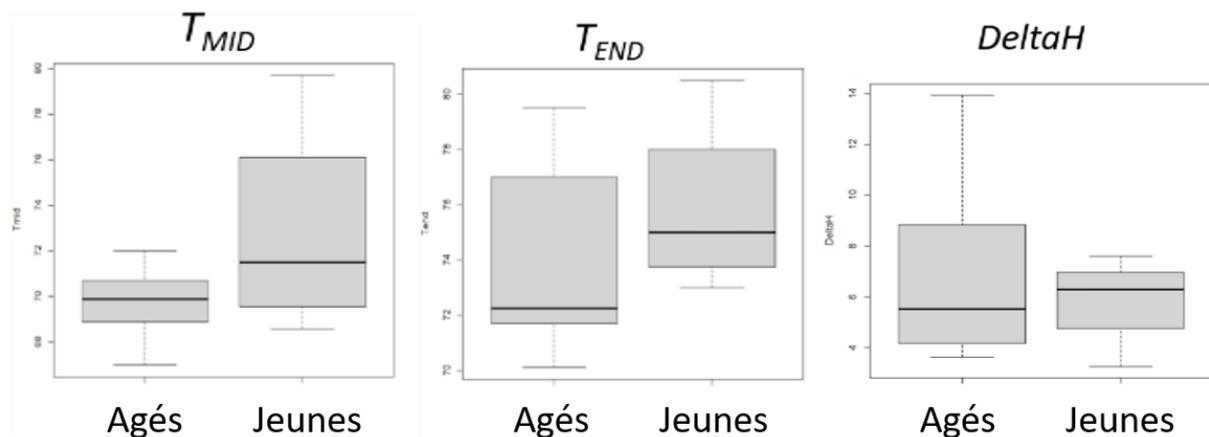


Figure 80: Boîtes de dispersion des paramètres de dénaturation du collagène (T_{MID} , T_{END} et l'enthalpie ΔH) en fonction de la classe d'âge

Aucune différence significative n'est observée au niveau de l'enthalpie de dénaturation **pour l'ensemble des deux populations**.

En revanche, une diminution significative des températures T_{ONSET} ($p=0.008156$) et T_{MAX} ($p=0.0044$) est observée avec l'âge.

IV.B.2. Lien entre les marqueurs thermiques et le score OHAT

Comme reporté en Annexe16 aucune différence significative n'est mise en évidence entre le score OHAT et la quantification hydrique et les paramètres de dénaturation du collagène.

IV.B.3. Lien entre les marqueurs thermiques et les signes cliniques locaux inflammatoires

Pour l'ensemble des deux populations, aucune différence significative n'est observée au niveau des paramètres thermiques pour des patients présentant des signes cliniques locaux tels que les risques inflammatoires et la présence de gingivite (Annexe 17).

IV.B.4. Lien entre les marqueurs thermiques et les pathologies

- Diabète

Les analyses ne montrent aucune différence significative entre les marqueurs thermiques et les patients atteints de diabète, pour l'ensemble des deux populations (Annexe 18).

- Maladies cardiovasculaires

Les boîtes de dispersion, tests d'homogénéité des variances et test de normalité pour les données thermiques en fonction des maladies cardiovasculaires sont présentés en Annexe 19.

Pour l'ensemble des deux populations, il est à noter une diminution significative du pourcentage en eau totale ($p=0.03882$) chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires (Figure 81).

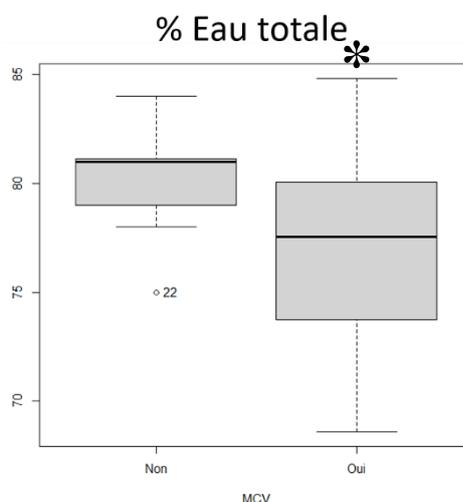


Figure 81: Boîtes de dispersion de la quantité d'eau totale en fonction des maladies cardiovasculaires

- Troubles psycho-cognitifs

Les boîtes de dispersion, tests d'homogénéité des variances et test de normalité pour les données thermiques en fonction des troubles psycho-cognitifs sont présentés en Annexe 20.

La Figure 82 montre une diminution significative du pourcentage en eau liée pour les patients atteints de troubles psycho-cognitifs ($p=0.04406$).

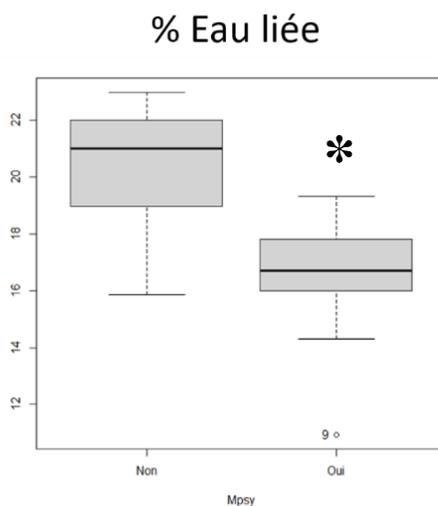


Figure 82: Boîtes de dispersion de la quantité d'eau liée en fonction des troubles psycho-cognitifs

IV.B.5. Lien entre les marqueurs thermiques et les traitements médicamenteux

- Anticoagulants

Aucun lien significatif n'est observé entre les données thermiques et la prise d'anticoagulants. Les boîtes de dispersion, tests d'homogénéité des variances et test de normalité pour les données thermiques en fonction des anticoagulants sont présentés en Annexe 21.

- Traitements des maladies cardiovasculaires

Les analyses ne décèlent aucun lien significatif entre les traitements des maladies cardiovasculaires et les données thermiques, **pour l'ensemble des deux populations**. Les boîtes de dispersion tests d'homogénéité des variances et test de normalité pour les données thermiques en fonction des traitements de maladies cardiovasculaires sont présentés en Annexe 22. En revanche, Il a été observé une augmentation significative de ΔH ($p=0.04342$) chez les patients prenant des traitements des maladies cardiovasculaires, **au sein de la population âgée** (Figure 83).

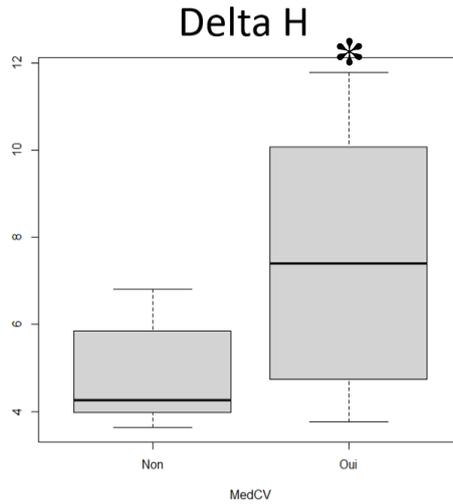


Figure 83: Boîtes de dispersion de l'enthalpie ΔH en fonction des traitements des maladies cardiovasculaires (pour les patients âgés uniquement)

- Psychotropes

Parmi les analyses figurant en Annexe 23 seule une diminution significative du pourcentage en eau totale ($p=0.006486$) des muqueuses buccales humaines est observée chez les patients sous psychotropes (Figure 84).

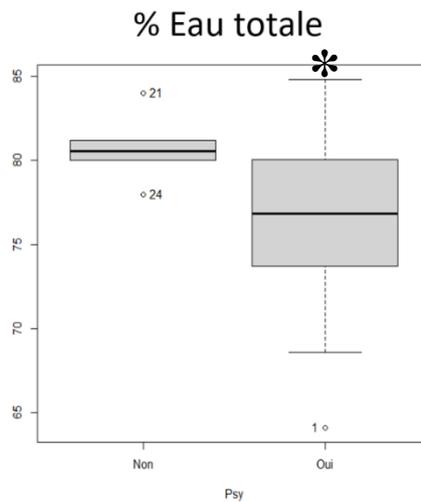


Figure 84: Boîtes de dispersion de l'eau totale en fonction de la prise de psychotropes

IV.C Marqueurs vibrationnels

En réponse à l'objectif principal, nous avons tout d'abord comparé la réponse vibrationnelle des échantillons de patients âgés à celle des patients jeunes, en identifiant d'éventuelles variations au niveau des bandes d'absorptions indexées (voir chapitre III).

Nous avons ensuite réalisé des analyses multivariées afin de comparer la réponse vibrationnelle globale des échantillons en fonction des données cliniques.

Enfin, nous avons étudié l'évolution de la composition moléculaire des couches constitutives de la muqueuse buccale et celle de la salive en fonction des données cliniques via les analyses uni-variées des différents indicateurs.

IV.C.1. Lamina propria

La Figure 85 présente l'ensemble des spectres de la *lamina propria* des muqueuses humaines prélevées à l'état hydraté.

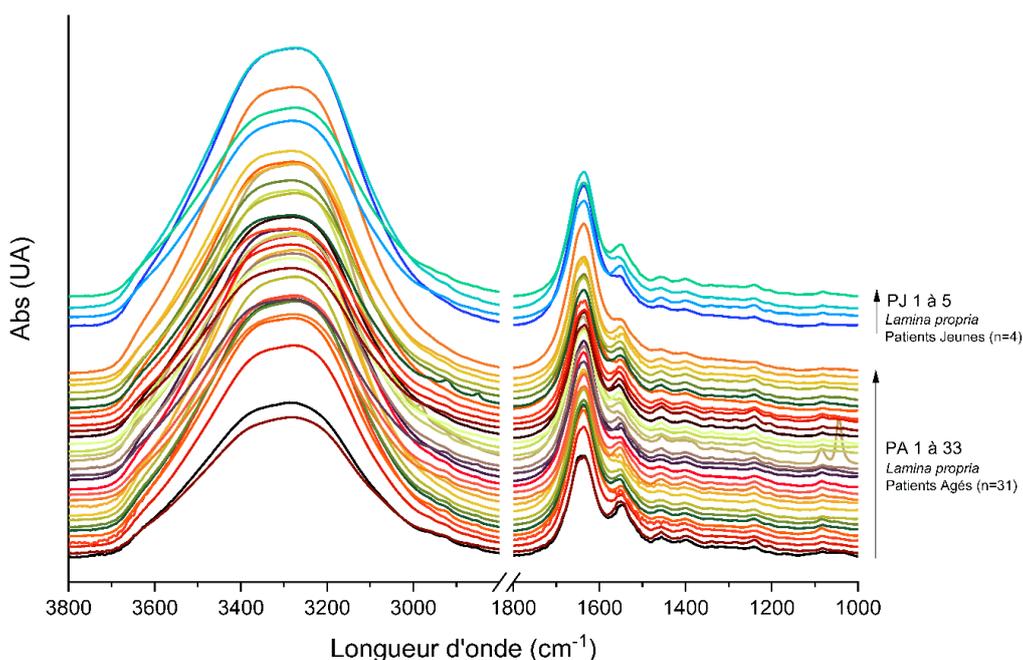


Figure 85: Spectres IRTF de la lamina propria de muqueuses buccales de patients jeunes et âgés

La Figure 86 présente les réponses vibrationnelles moyennées des *lamina propria* de patients jeunes et âgés, dans la zone $[3800-1000 \text{ cm}^{-1}]$.

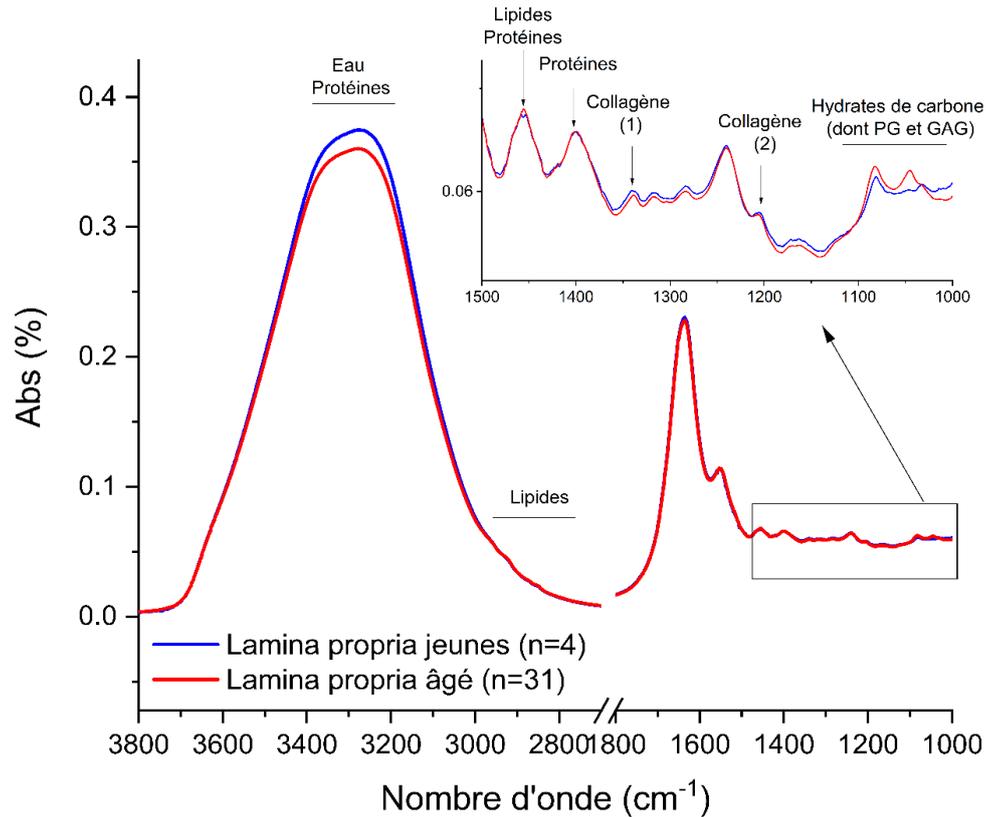


Figure 86: Spectres IRTF moyennés des lamina propria de patients jeunes (n=5) et âgés (n=33), dans la zone [3800-1000 cm⁻¹].

Les spectres moyens révèlent peu de différences sur la position des bandes ainsi que sur leur intensité.

Le Tableau 31 répertorie l'indexation la plus probable des différentes bandes d'absorptions de la lamina propria humaine. A titre de comparaison, nous avons reporté dans ce même tableau les positions des bandes d'absorption du derme humain et de la lamina propria de la gencive porcine à l'état hydraté.

Tableau 31: Indexation probable des bandes d'absorption IR dans échantillons muqueux humain et porcins ainsi que dans le derme humain à l'état hydraté

Assignations	Position des bandes /cm ⁻¹		
	Lamina propria humaine	Derme Humain	Lamina propria porcine
Amide A : Principalement $\nu(\text{N-H})$ des protéines et $\nu(\text{O-H})$ de l'eau (fortement dépendant de l'hydratation)	[3600-3000]	[3600-3000]	[3600-3000]
Amide B : Principalement $\nu(\text{N-H})$ des protéines et $\nu(\text{C-H})$ des cycles aromatiques	3080	3073	3074
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ des protéines, lipides	2959	2957	2956
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ des lipides, protéines	2922	2923	2915-2928
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ des protéines, lipides	2872	2873	2874
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ des lipides, protéines	2851	2853	2849
$\nu(\text{C=O})$ des lipides estérifiés	--	1744	--
Amide I : $\nu(\text{C=O})$ des protéines et $\delta(\text{O-H})$ de l'eau	[1718-1577]	[1694-1630]	[1718-1574]
Amide II : $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$ des protéines	[1577-1484]	[1558-1542]	[1574-1479]
$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ des protéines, lipides	1457	1455	1452
$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ des protéines et des lipides	[1432-1361]	[1406-1389]	[1419-1354]
$\delta(\text{CH}_2)$ wagging de la chaîne latérale de la proline (bande spécifique du collagène)	1338	1338	1337
Amide III : $\delta_{\text{plan}}(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C-N})$ des protéines	[1328-1192]	[1320-1202]	[1312-1190]
1282 cm ⁻¹ : $\delta(\text{CH}_3)$ spécifique de la MEC (principalement collagène)	1283	1282	1282
1205 cm ⁻¹ : $\delta(\text{C-OH})$ spécifique de la MEC (principalement collagène)	1207	1205	1207
1160 cm ⁻¹ : $\nu(\text{C-O})$ collagène et hydrates de carbones	--	1161	1159
1081 cm ⁻¹ : $\nu(\text{C-O-C})$ du collagène, glycolipides, protéoglycanes et $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ des phospholipides et ADN	1082	1080	1078
1056 cm ⁻¹ : $\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$ des hydrates de carbone	1051	1055	1055
1032 cm ⁻¹ : $\nu_{\text{s}}(\text{CO-O-C})$ des hydrates de carbone dans le collagène et les GAG	1032	1032	1032

Les bandes d'absorption de la *lamina propria* humaine sont similaires à celles relevées pour la *lamina propria* porcine et le derme humain. L'étude de faisabilité (chapitre III) et les travaux menés sur le derme mettent en évidence encore une fois la robustesse du protocole de caractérisation à l'échelle moléculaire.

IV.C.1.1 Analyse en composantes principales

Avant de réaliser les analyses statistiques univariées, nous avons jugé intéressant de rechercher des éventuels liens entre la réponse vibrationnelle globale de la *lamina propria* et les différentes variables catégorielles (classe d'âge, indices OHI, SBI et OHAT, pathologies, prise médicamenteuse) par ACP dans différentes zones d'étude :

- (3000-2800 cm^{-1}) \cup (1800-1000 cm^{-1})
- (1800-1000 cm^{-1})
- (1490-1000 cm^{-1})

Pour l'ensemble des deux populations, une discrimination des réponses vibrationnelles globales dans ces différentes zones d'étude est détectée pour les patients présentant des troubles psycho-cognitifs (Figure 87) et ceux présentant des signes cliniques locaux (Figure 88). Seules les ACP effectuées dans la zone [1490-1000 cm^{-1}] sont présentées ci-après.

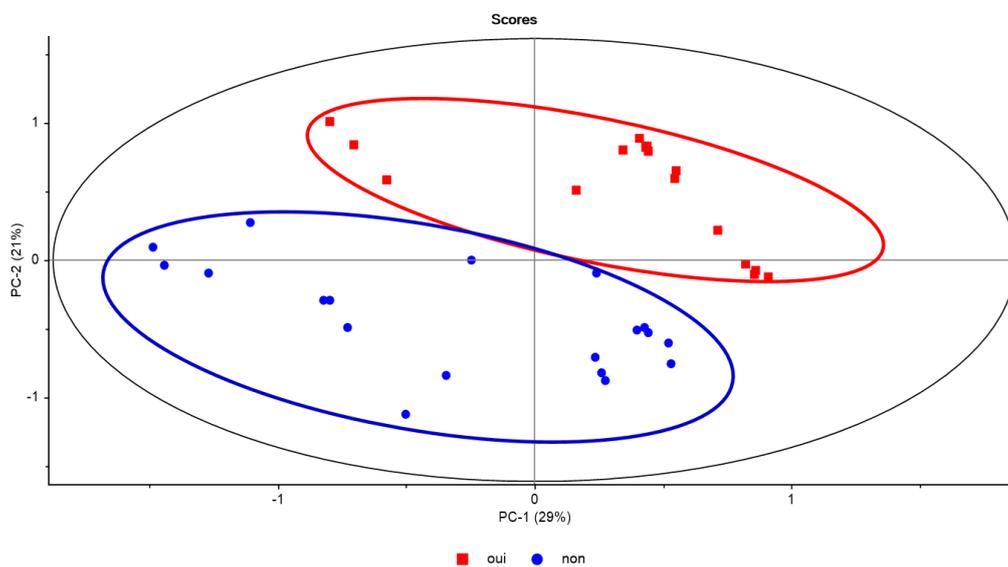


Figure 87: Projection des profils IRTF de la couche lamina propria sur PC1 et PC2 regroupement suivant les troubles psycho-cognitifs (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})

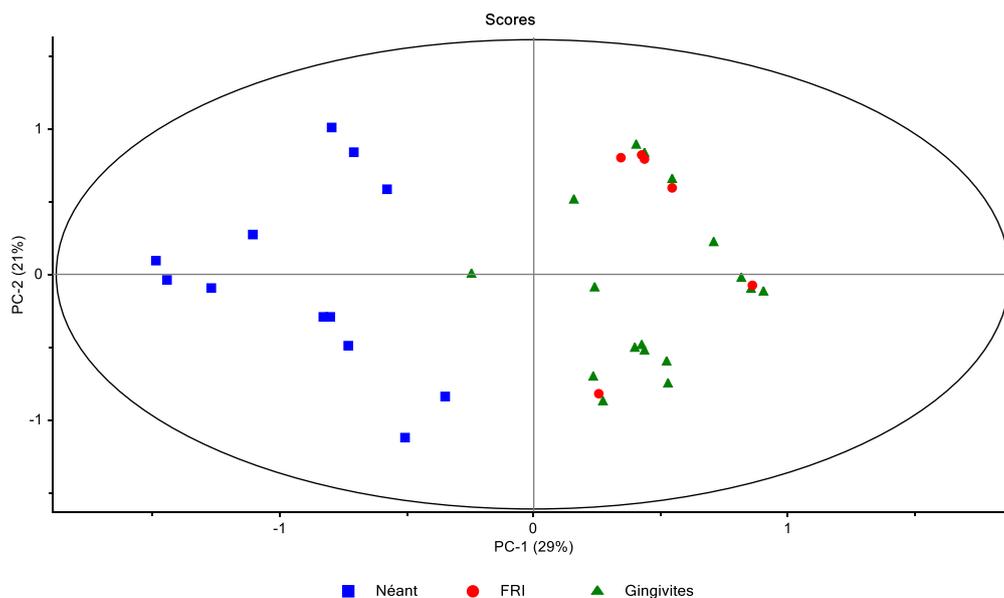


Figure 88: Projection des profils IRTF de la couche lamina propria sur PC1 et PC2 regroupement suivant les signes cliniques locaux (dans la zone 1490-1000 cm⁻¹)

Le regroupement des spectres selon les autres variables catégorielles ne présentant pas de discrimination notable sont présentés en annexe (de l'Annexe 25 à l'Annexe 28).

IV.C.1.2 Analyse univariée des marqueurs vibrationnels spécifiques

Les boîtes de dispersion, la distribution des marqueurs vibrationnels de la *lamina propria* ainsi que les tests d'homogénéité des variances et de normalité sont présentés en annexe (de l'Annexe 29 à l'Annexe 38).

IV.C.1.2.1 Lien entre les marqueurs vibrationnels et l'âge

Les analyses univariées des marqueurs vibrationnels de la *lamina propria* en fonction de l'âge des patients ne montrent aucune différence significative (Annexe 30).

IV.C.1.2.2 Lien entre les marqueurs vibrationnels et les signes cliniques locaux

Pour l'ensemble des deux populations, nous observons une diminution significative de l'indicateur « collagène/protéines » (**p=0.0164**) chez les patients atteints de gingivite (Figure 89)

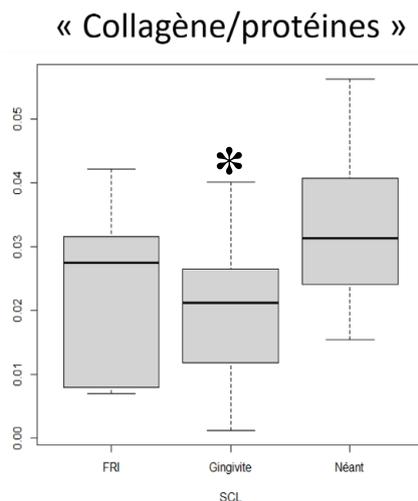


Figure 89: Boîtes de dispersion de l'aire (1338 cm⁻¹)/aire (1540 cm⁻¹) en fonction des signes cliniques locaux

Nous avons également suivi l'évolution de cet indicateur **uniquement au sein de la population de patients âgés** (Figure 90). Nous remarquons une diminution significative de l'indicateur « collagène/protéines » (**p=0.0438**) chez les patients atteints de signes cliniques locaux.

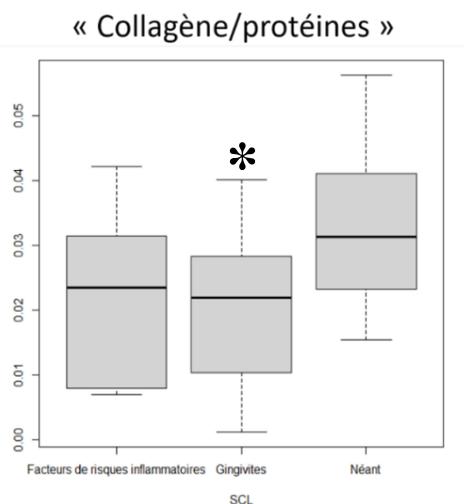


Figure 90: Boîtes de dispersion de l'aire (1338 cm⁻¹)/aire (1540 cm⁻¹) en fonction des signes cliniques locaux (pour les patients âgés uniquement)

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de la *lamina propria* en fonction des signes cliniques locaux sont présentées en Annexe 31.

IV.C.1.2.1 Lien entre les marqueurs vibrationnels et le score d'OHAT

Pour l'ensemble des deux populations, aucune différence significative n'est observée entre les marqueurs vibrationnels et le score OHAT (Annexe 32).

IV.C.1.2.2 Lien entre les marqueurs vibrationnels et les pathologies générales

- Diabète

Il est à noter une augmentation significative de l'indicateur « lipides/protéines » ($p=0.0363$) chez les patients atteints de diabète, **pour l'ensemble des deux populations** (Figure 91).

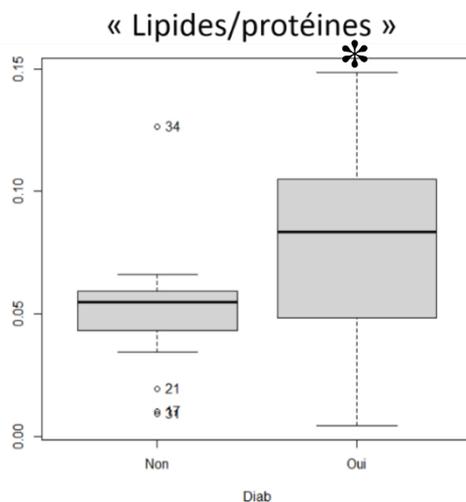


Figure 91: Boîtes de dispersion de l'aire (3000-2800 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction du diabète

Nous remarquons également une augmentation significative de l'indicateur ($p=0.009843$) chez les patients diabétiques de la **population de patients âgés** (Figure 92).

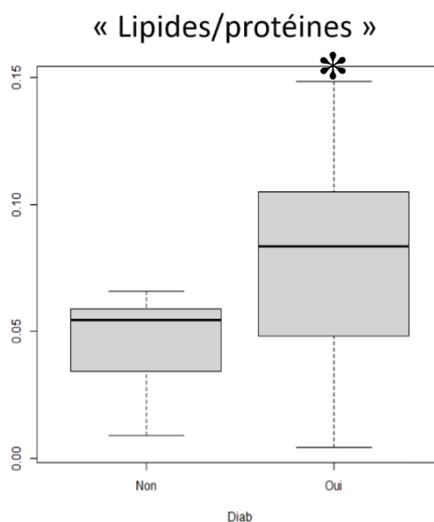


Figure 92: Boîtes de dispersion de l'aire (3000-2800 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction du diabète (pour les patients âgés uniquement)

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de la *lamina propria* en fonction du diabète sont présentées en Annexe 33.

- Autres pathologies

Pour l'ensemble des deux populations ainsi que pour la population de patients âgés, les analyses univariées des marqueurs vibrationnels en fonction des maladies cardiovasculaires et les troubles psycho-cognitifs ne révèlent aucune évolution significative (Annexe 34 et Annexe 35).

IV.C.1.2.3 Lien entre les marqueurs vibrationnels et les aux traitements médicamenteux

- Traitements des maladies cardiovasculaires

Pour l'ensemble des deux populations, l'indicateur « Amide A/protéines » diminue significativement ($p=0.02146$) chez les patients traités pour des affections cardiovasculaires (Figure 93).

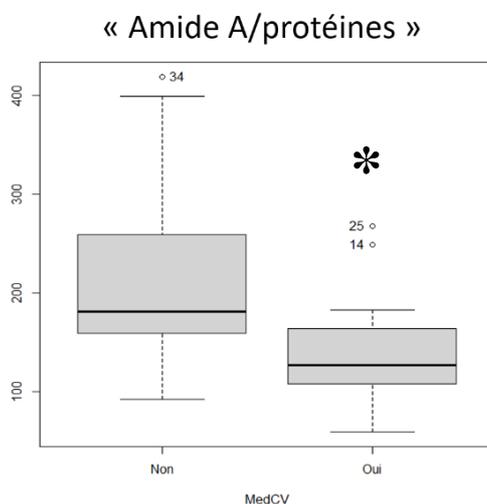


Figure 93: Boîtes de dispersion de l'aire (4000-2800 cm^{-1})/l'aire (1540 cm^{-1}) en fonction des traitements des maladies cardiovasculaires

Compte-tenu de l'indexation de l'amide A (Tableau 31), cet indicateur est très certainement associé à une modification importante du réseau de liaisons hydrogène et de l'organisation hydrique, même s'il nous apparaît délicat de proposer une explication plus poussée en raison de la complexité du mode amide A.

La diminution significative de cet indicateur ($p=0.01975$) est également observée chez les patients prenant ce type de traitement, **au sein de la population de patients âgés** (Figure 94).

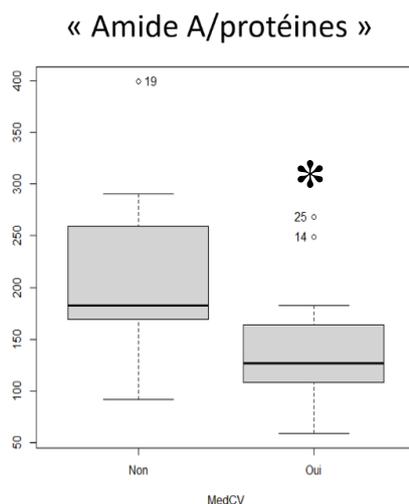


Figure 94: Boîtes de dispersion de l'aire (4000-2800 cm^{-1})/l'aire (1540 cm^{-1}) en fonction des traitements des maladies cardiovasculaires (pour les patients âgés uniquement)

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de la *lamina propria* en fonction des traitements des maladies cardiovasculaires sont présentées en Annexe 36.

- Psychotropes

Aucune différence significative est observée entre les marqueurs vibrationnels de la *lamina propria* en fonction des psychotropes (Annexe 37).

- Anticoagulants

Au sein de la population de patients âgés, il est à noter une augmentation significative de l'indicateur « lipides/protéines » ($p=0.0111$) au sein de la *lamina propria* de patients sous anticoagulants (Figure 95).

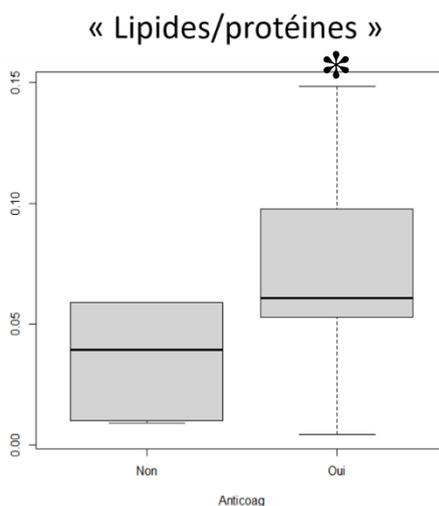


Figure 95: Boîtes de dispersion de l'aire (3000-2800 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction des anticoagulants (pour les patients âgés uniquement)

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de la *lamina propria* en fonction des anticoagulants sont présentées en Annexe 38.

IV.C.2. *Épithélium*

La Figure 96 présente l'ensemble des spectres IRTF des *épithélia* de patients jeunes (n=5) et âgés (n=33), dans la zone [3800-1000 cm^{-1}].

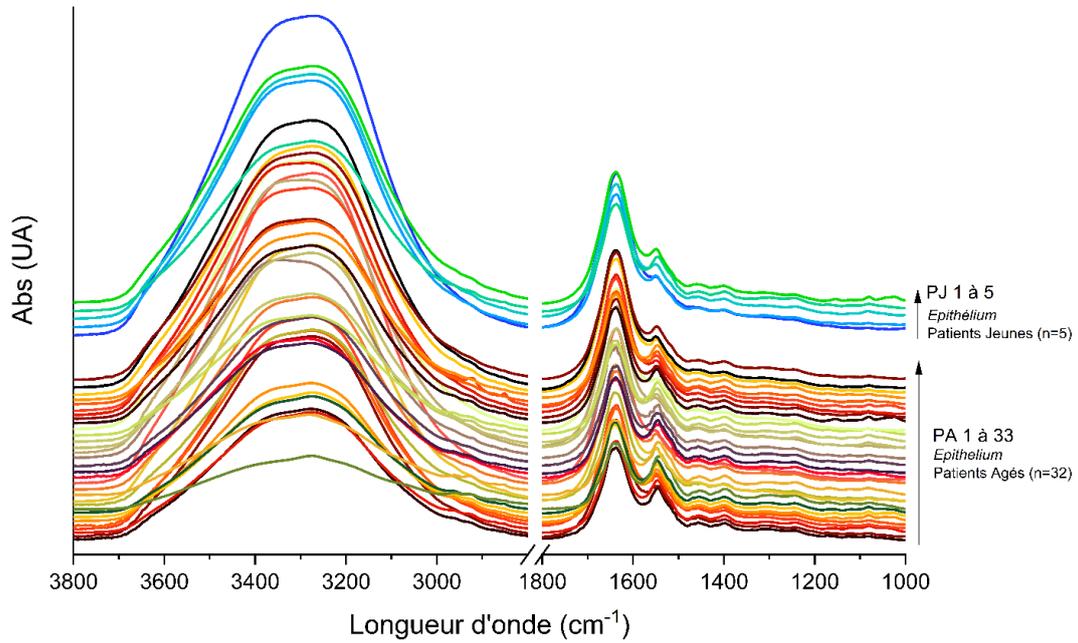


Figure 96: Spectres IRTF de l'épithélium de muqueuses buccales de patients jeunes et âgés dans la zone [3800-1000 cm^{-1}]

La Figure 97 représente les spectres IRTF moyennés des *épithélia* de patients âgés et jeunes dans la zone [3800-1000 cm^{-1}].

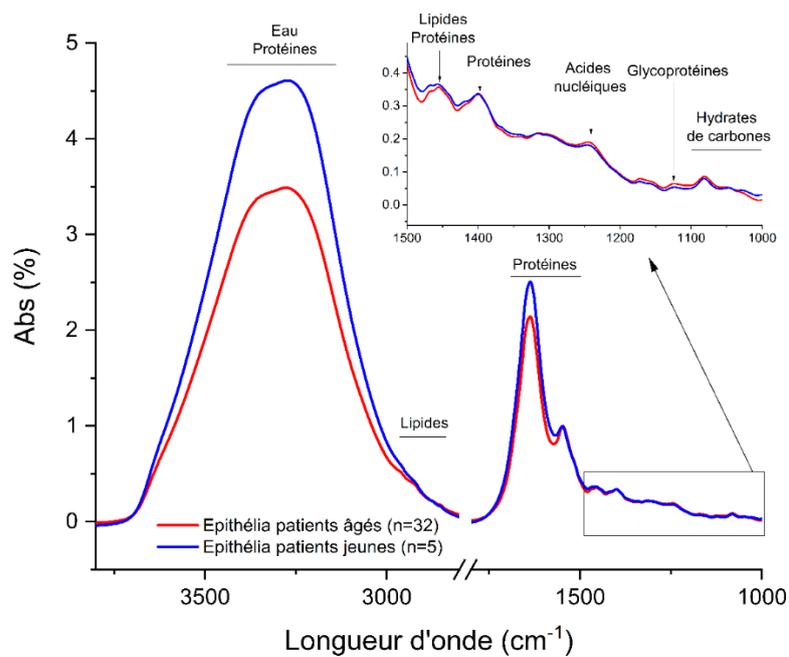


Figure 97: Spectres moyennés des épithélia humains dans la zone [3800-1000 cm^{-1}]

Les positions des bandes sont retrouvées aux mêmes positions pour les spectres moyens des deux classes d'âge ; en revanche, nous notons une diminution des amides A et I sur le spectre moyen des patients âgés.

Pour l'ensemble des spectres, il est à noter l'absence de la bande 1745 cm^{-1} généralement associée aux vibrations C=O des lipides estérifiés au sein des tissus biologiques. De plus, nous observons de très faibles intensités dans la zone des (CH_x) [$3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$]. Cela suggère une faible teneur en lipides au sein des *épithélia* oraux.

IV.C.2.1 Analyse en composantes principales

Comme pour la *lamina propria*, nous avons recherché les éventuels liens entre la réponse vibrationnelle globale de la couche épithéliale et les différentes variables catégorielles (classe d'âge, indices OHI, SBI et OHAT, et pathologies) par ACP dans les zones d'études considérées dans la partie 1.3.1.1.

Les projections des profils IRTF des échantillons en fonction des composantes principales suivant les variables catégorielles sont présentées en annexes (de l'Annexe 39 à l'Annexe 44). Dans le cas de la réponse spectrale des *épithélia*, aucune discrimination n'est observée.

IV.C.2.2 Analyse univariée des marqueurs vibrationnels spécifiques

La distribution des marqueurs vibrationnels de l'*épithélium*, les boîtes de dispersion, ainsi que les tests d'homogénéité des variances et de normalité sont présentés en annexe (de l'Annexe 45 à l'Annexe 54).

IV.C.2.2.1 Lien entre les marqueurs vibrationnels et l'âge

Les analyses univariées ne décèlent aucune évolution significative des indicateurs avec l'âge (Annexe 46).

IV.C.2.2.2 Lien entre les marqueurs vibrationnels et les signes cliniques locaux inflammatoires

Il est à noter que les marqueurs vibrationnels des *épithélia* ne varient pas significativement chez les patients présentant des signes cliniques locaux (Annexe 47).

IV.C.2.2.3 Lien entre les marqueurs vibrationnels et le score OHAT

De même, les marqueurs vibrationnels des *épithélia* ne varient pas en fonction du score OHAT (Annexe 48).

IV.C.2.2.4 Lien entre les marqueurs vibrationnels et les pathologies

- Diabète

Pour l'ensemble des deux populations, la Figure 98 montre une diminution significative de l'indicateur « Amide A/protéines » chez les patients atteints de diabète ($p=0.01307$).

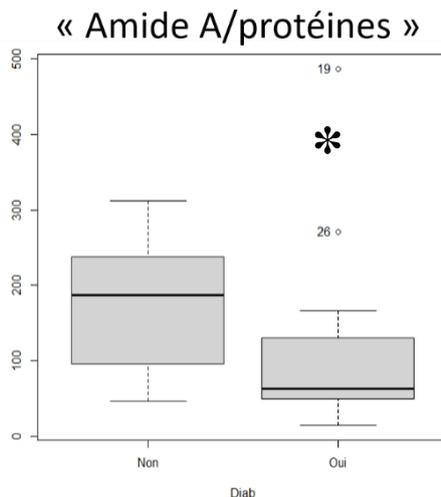


Figure 98: Boîtes de dispersion de l'aire (4000-2800 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction du diabète

Au sein de la population de patients âgés, on note une également une diminution de l'indicateur « Amide A/protéines » ($p=0.03494$) chez les patients diabétiques (Figure 99).

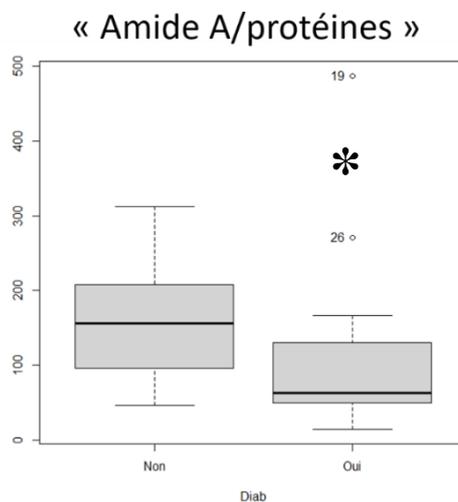


Figure 99: Boîtes de dispersion de l'aire (4000-2800 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction du diabète (pour les patients âgés uniquement)

La Figure 100 montre une diminution significative de l'indicateur « Glycogène et glucose /protéines » ($p=0.01129$) chez les patients atteints de diabète **au sein de la population de patients âgés**.

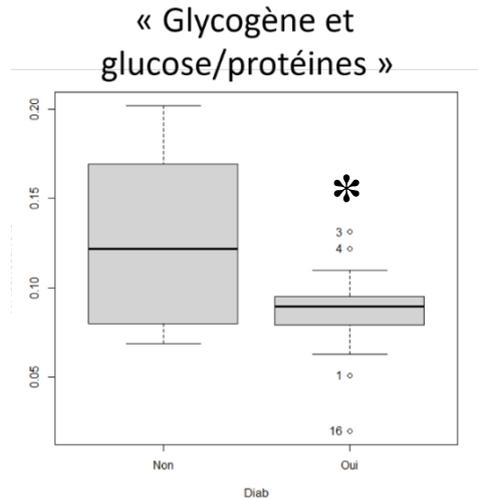


Figure 100: Boîtes de dispersion de l'aire (1100-1000 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction du diabète (pour les patients âgés uniquement)

Pour l'ensemble des deux populations, nous observons une augmentation de la fraction protéique ($p=0.02048$) ainsi qu'une diminution de l'indicateur « Acides nucléiques/protéines » ($p=0.01028$) chez les patients atteints de diabète (respectivement Figure 101 et Figure 102).

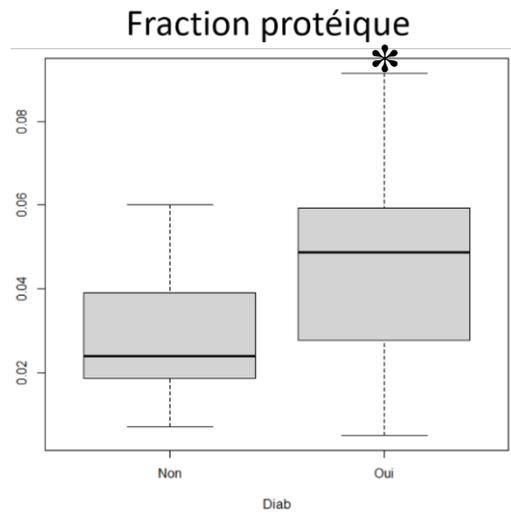


Figure 101: Boîtes de dispersion de l'aire (1540 cm^{-1})/l'aire (1800-1000 cm^{-1}) en fonction du diabète

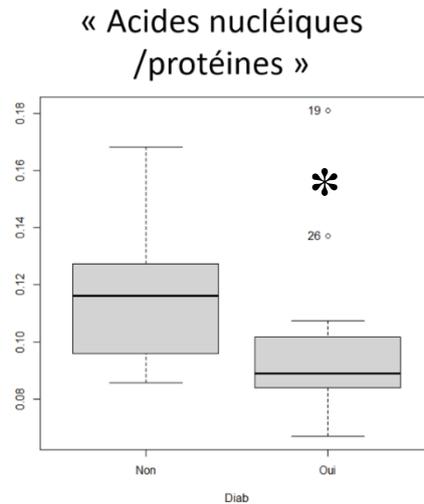


Figure 102: Boîtes de dispersion de l'aire (1241 cm¹)/l'aire (1540 cm¹) en fonction du diabète

Les indicateurs sont également analysés **au sein de la population de patients âgés** et nous retrouvons la même tendance ; à savoir une augmentation de la fraction protéique (**p=0.04453**) ainsi qu'une diminution de l'indicateur « Acides nucléiques/protéines » (**p=0.02902**) chez les patients âgés atteints de **diabète** (respectivement Figure 103 et Figure 104).

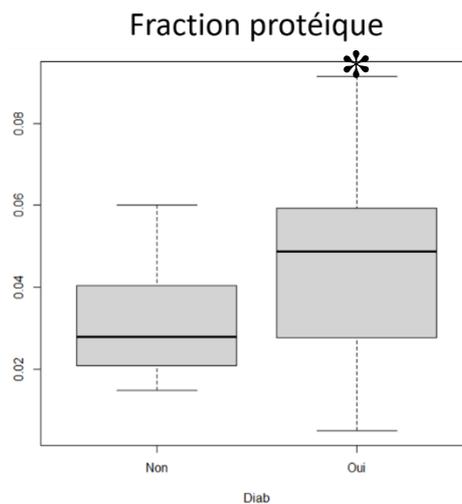


Figure 103: Boîtes de dispersion de l'aire (1540 cm¹)/l'aire (1800-1000 cm¹) en fonction du diabète (pour les patients âgés uniquement)

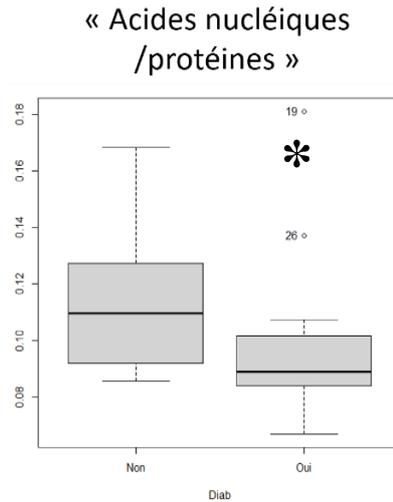


Figure 104: Boîtes de dispersion de l'aire (1241 cm^{-1})/l'aire (1540 cm^{-1}) en fonction du diabète (pour les patients âgés uniquement)

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de l'épithélium en fonction du diabète sont présentées en Annexe 49.

- Maladies cardiovasculaires

Au sein de la population de patients âgés, nous observons une augmentation significative de l'indicateur « Glycogène et glucose/protéines » ($p=0.003694$) au sein des épithélia de patients atteints de maladies cardiovasculaires (Figure 105).

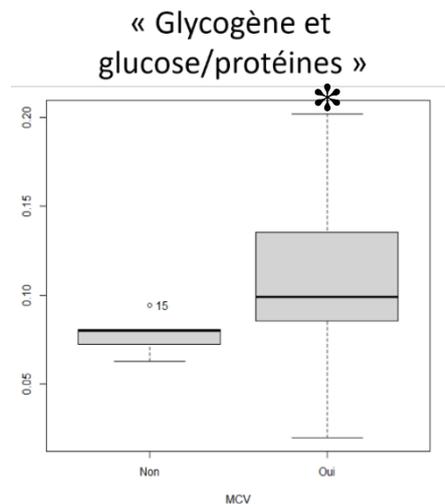


Figure 105: Boîtes de dispersion de l'aire (1100-1000 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction des maladies cardiovasculaires (pour les patients âgés uniquement)

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de l'épithélium en fonction des maladies cardiovasculaires sont présentées en Annexe 50.

- Troubles psycho-cognitifs

Nous remarquons sur la Figure 106 une augmentation significative de l'indicateur « Glycogène et glucose /protéines » ($p=0.03062$) chez les patients atteints de troubles psycho-cognitifs (**pour l'ensemble des deux populations**).

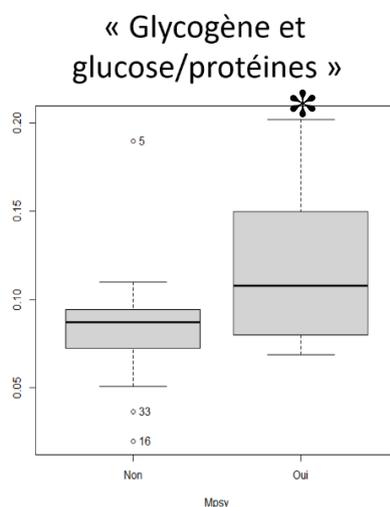


Figure 106: Boîtes de dispersion de l'aire (1100-1000 cm^{-1})/l'aire (1540 cm^{-1}) chez les patients atteints de troubles psycho- cognitifs

Nous observons également une augmentation significative de l'indicateur « Glycogène et glucose/protéines » ($p=0.02563$) **uniquement chez les patients âgés** atteints de troubles psycho-cognitifs (Figure 107).

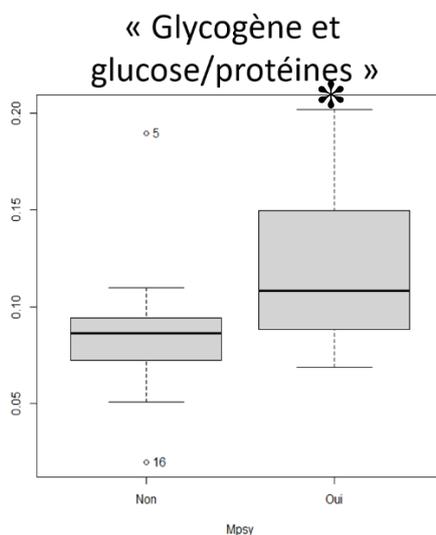


Figure 107: Boîtes de dispersion de l'aire (1100-1000 cm^{-1})/l'aire (1540 cm^{-1}) chez les patients atteints de troubles psycho- cognitifs (pour les patients âgés uniquement)

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de l'épithélium en fonction des maladies cardiovasculaires sont présentées en Annexe 51.

IV.C.2.2.5 Lien entre les marqueurs vibrationnels et traitements médicamenteux

Dans l'ensemble des deux populations, aucun lien significatif n'est observé entre les marqueurs vibrationnels des *épithélia* et les traitements médicamenteux (de l'Annexe 52 à l'Annexe 54).

IV.C.3. Le biofluide

Dans cette partie, les analyses portent sur la détermination de biomarqueurs du biofluide de la cavité buccale : la salive.

En préliminaire, des analyses IRTF-ATR ont été réalisées sur des échantillons de salive de trois participants, membres de l'équipe Phypol entrant dans la classe d'âge 20-40 ans.

La Figure 108 présente le spectre IRTF moyenné d'échantillons de salive, normalisé à l'amide II. Ce spectre servira à l'indexation des pics pour l'étude MMOBUCC.

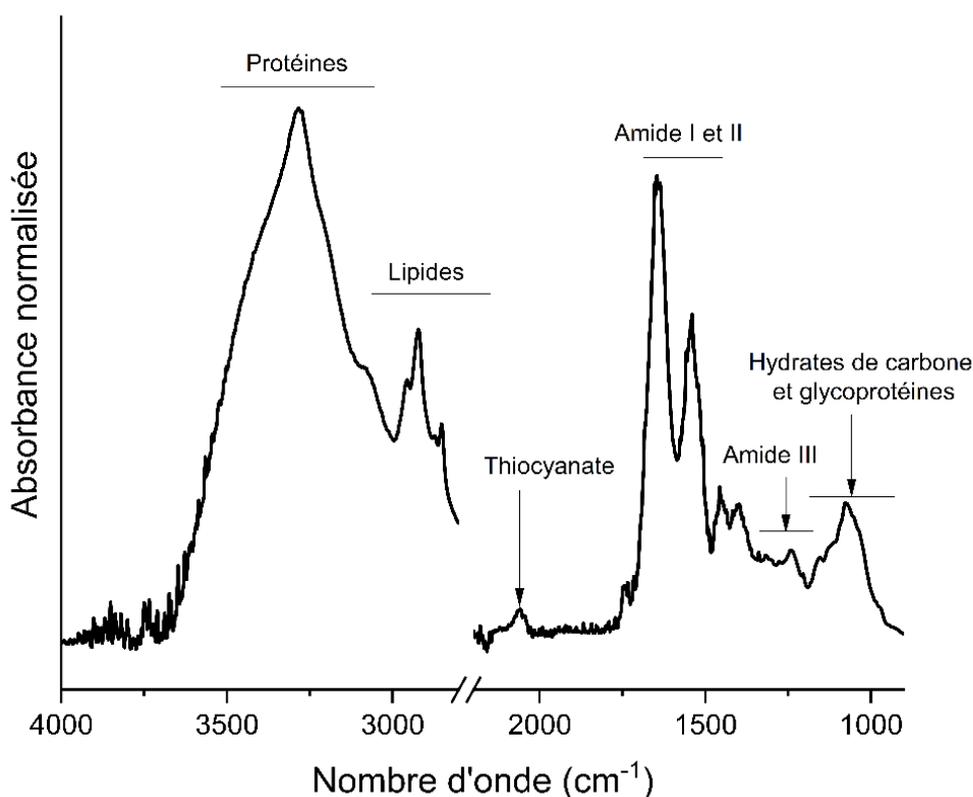


Figure 108: Spectre moyenné d'échantillons salivaires dans la zone [4000-950 cm^{-1}]

Dans le Tableau 32 sont reportées les principales bandes d'absorption du film salivaire ainsi que leur indexation établie en accord avec la littérature.

Tableau 32: Indexation des données spectrales salivaires

Position de la bande/cm ⁻¹	Assignations	Références
3375-3289	$\nu_{as}(N-H)$ et $\nu(O-H)$: Amide A des protéines	[211]–[213]
3073	$\nu(NH)/\nu(CH)$: Amide B (α -amylase, albumine, cystéine, mucines, protéines riches en prolines, IgA) / cycle aromatique	[90]
3000-2800	$\nu_{as}(CH_3)$: protéines, lipides $\nu_{as}(CH_2)$: lipides, protéines $\nu_s(CH_3)$: protéines, lipides $\nu_s(CH_2)$: lipides, protéines	[211]–[213]
2060	$\nu(C-N)$ Thiocyanate (SCN^-) (sensible au tabac et diabète)	[111] [211]–[213]
1740	$\nu(C=O)$ lipides estérifiés	[113]
1694-1630	$\nu(C-O)$: Amide I des protéines (α -amylase, albumine, cystéine, mucines, protéines riches en prolines, IgA)	[87], [212]– [215]
1558-1542	$\delta(N-H)$ et $\nu(C-N)$: Amide II des protéines (α -amylase, albumine, cystéine, mucines, protéines riches en prolines, IgA)	[211]–[215]
1453	$\rho_b(CH_3)/\delta(CH_2/CH_3)$: protéines et lipides + méthylènes des acides aminés	[87], [212]– [214]
1400	$\nu_s(COO^-)$: acide lactique et acides gras	[113], [212], [213], [216]
1330-1270	$\rho_b(N-H)$ et $\nu(C-N)$: Amide III avec composante majoritaire des protéines en hélices α $\rho_b(CH_2)$ acides aminés, des phospholipides, acides gras, triglycérides	[217]
1270-1190	$\rho_b(N-H)$ et $\nu(C-N)$: Amide III avec composante majoritaire des protéines en feuilletts et tours β $\nu_{as}(PO^{2-})$: Composés phosphatés	[217]
1190-1000	1159 cm ⁻¹ : $\nu(C-O-C)$ résidus d'hydrates de carbones 1078 cm ⁻¹ : $\nu(PO^{2-})$ phospholipides, $\nu(CN)$ glycoprotéines (mucines ou α -amylase glycosylée), $\nu(C-O)$ hydrates de carbones, $\nu(C-O-H)$ tyrosine des protéines 1040 cm ⁻¹ : νCC , νCO , νCH_2OH hydrates de carbones et glycoprotéines (mucines) ou α -amylase glycosylée 1021 cm ⁻¹ : νCO , $\rho_b(C-O-H)$ hydrates de carbones et glycoprotéines (mucines) ou α -amylase glycosylée	[211]–[216]

Comme détaillé dans le chapitre III, la salive est un mélange de protéines, glycoprotéines, sucres, lipides, enzymes et ions.

Comme dans les tissus biologiques et les protéines, le spectres IRTF de la salive présente un mode amide A intense à 3287 cm⁻¹ correspondant aux élongations $\nu(N-H)$ et $\nu(O-H)$.

Comme les spectres IRTF de tissus biologiques et de protéines, le spectre IRTF de la salive présente les modes intenses amides I et II (1650 et 1540 cm⁻¹) associés à la présence de protéines.

Comme indiqué dans le tableau d'indexation, la zone d'absorption [1330-1990 cm^{-1}] correspond à la superposition de bandes d'absorptions associées aux protéines (Amide III) constitutives de la salive, aux acides aminés des composés phosphatés et phospholipides.

Une récente étude sur la réponse vibrationnelle de la salive, de patients touchés par le SARS-CoV-2, a mis en avant différentes certaines régions spectrales, qui semblent correspondre à la présence d'immunoglobulines suite à cette infection. En effet, la zone [1420-1289 cm^{-1}] serait associée aux IgM et la zone [1285-1237 cm^{-1}] aux IgA [218].

Les bandes 1453 et 1400 cm^{-1} sont respectivement associées aux modes de flexion asymétrique du CH_3 des groupes méthyles des protéines mais également aux méthylènes des lipides et acides gras des membranes cellulaires épithéliales provenant des tissus et aux vibrations symétriques d'étirement du radical carboxyle des groupes carboxylates, comme ceux de l'acide lactique ou des chaînes latérales des protéines dans la salive.

Les bandes observées dans l'intervalle de 1190 à 1000 cm^{-1} sont principalement attribués aux vibrations d'étirement C-O des hydrates de carbones. Par conséquent, les bandes 1035, 1078 et 1159 cm^{-1} proviennent des fragments de sucre. La plupart des protéines salivaires sont glycosylées. Les pics 1078 et 1035 cm^{-1} sont donc également attribués aux vibrations des glycoprotéines (mucines), des enzymes de la salive (α -amylase glycosylée) ou d'autres résidus de sucre.

Les bandes observées dans la zone [3000-2800 cm^{-1}] et le pic 1740 cm^{-1} correspondent majoritairement aux composés aliphatiques (dont les lipides totaux et protéines apolaires) et aux lipides estérifiés.

Spécifiques à la réponse spectrale de la salive, les anions thiocyanates (SCN^-) sont décelables en IRTF au pic 2060 cm^{-1} .

IV.C.3.1 Marqueurs vibrationnels salivaires retenus

Les indicateurs vibrationnels salivaires retenus sont présentés dans le Tableau 33 et sont issus de l'indexation des bandes présentée dans le Tableau 32.

Tableau 33: Marqueurs vibrationnels retenus de la salive

Indicateurs vibrationnels	Variable quantitative continue mesurée
Composés aliphatiques/protéines	Rapport aires 3000-2800 cm^{-1} /1540 cm^{-1}
Thiocyanate/ protéines	Rapport aires 2056 cm^{-1} /1540 cm^{-1}
Fraction protéique	Rapport aires 1540 cm^{-1} /1800-1000 cm^{-1}
Amide III-a /protéines	Rapport aires 1330-1268 cm^{-1} /1540 cm^{-1}
Amide III-b /protéines	Rapport aires 1270-1190 cm^{-1} /1540 cm^{-1}
Hydrates de carbones et glycoprotéines/ protéines	Rapport aires 1190-1000 cm^{-1} /1540 cm^{-1}

IV.C.3.2 Réponse vibrationnelle des échantillons salivaires MMOBUCC

La Figure 109 présente les spectres IRTF moyennés d'échantillons salivaires de patients MMOBUCC dans la zone [2200-900 cm^{-1}].

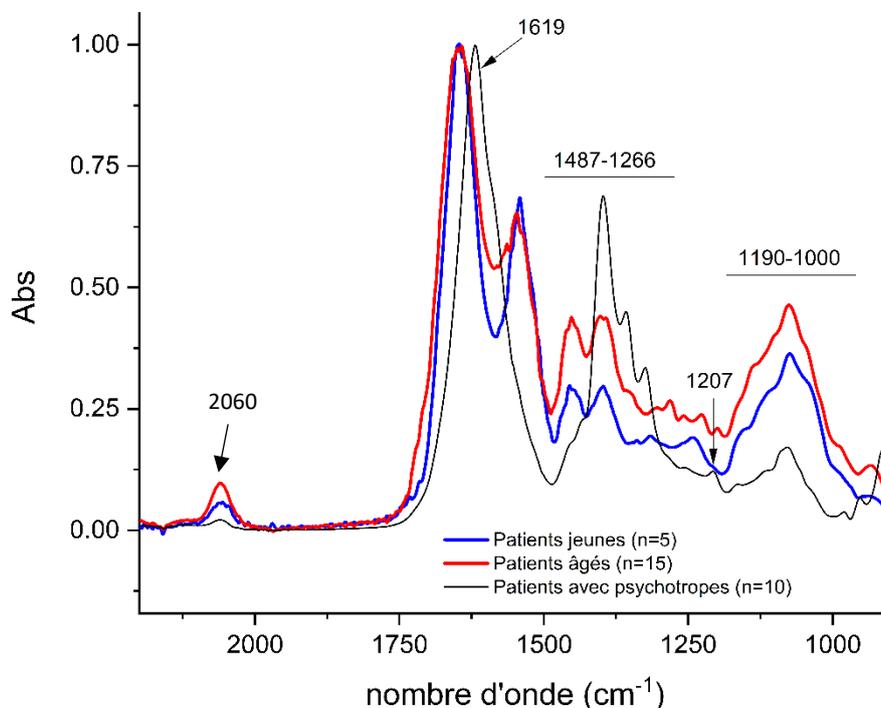


Figure 109: Spectres IRTF moyennés des échantillons de salives de patients jeunes (n=5), âgés (n=12) et de patients âgés prenant des psychotropes (n=10)

Nous observons très clairement d'importantes modifications de la réponse vibrationnelle pour les patients sous psychotropes. Ces modifications sont associées à une altération majeure de la composition moléculaire de la salive chez ce type de patients, notamment dans la région [1800-1000 cm^{-1}].

Nous remarquons notamment l'absence des amides I et II chez les patients sous psychotropes. En effet, les bandes amide I et II disparaissent au profit d'un unique et intense pic à 1619 cm^{-1} . De récents travaux (portant sur la comparaison et la discrimination du liquide séminal à d'autres fluides biologiques) ont reporté la modification de la réponse vibrationnelle du sperme dans la zone des amides I et II sans qu'aucune explication claire ne soit proposée [219].

L'ACP réalisée pour l'ensemble des échantillons dans la zone [1800-1000 cm^{-1}] (Figure 110) corrobore cette discrimination des échantillons salivaires de patients sous psychotropes.

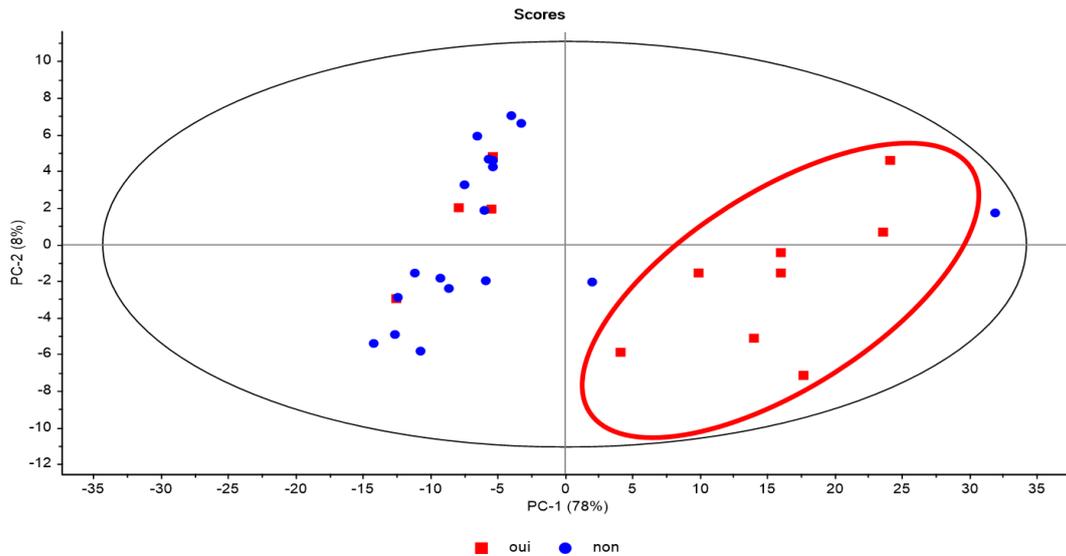


Figure 110: Projection des profils IRTF des échantillons salivaires sur PC1 et PC2 regroupement suivant la prise de psychotropes (dans la zone 1800-1000 cm^{-1})

Compte tenu des modifications drastiques de la signature vibrationnelle des patients sous psychotropes, nous avons réalisé les ACP en retirant les profils IRTF de ce type de patients.

De plus, nous avons ajouté la réponse IRTF de 3 individus jeunes (échantillons prélevés au sein de l'équipe Phypol), afin de réaliser une analyse plus robuste.

L'ACP présentée sur la Figure 111 ne met pas en évidence la discrimination des profils IRTF des patients suivant les deux classes d'âge.

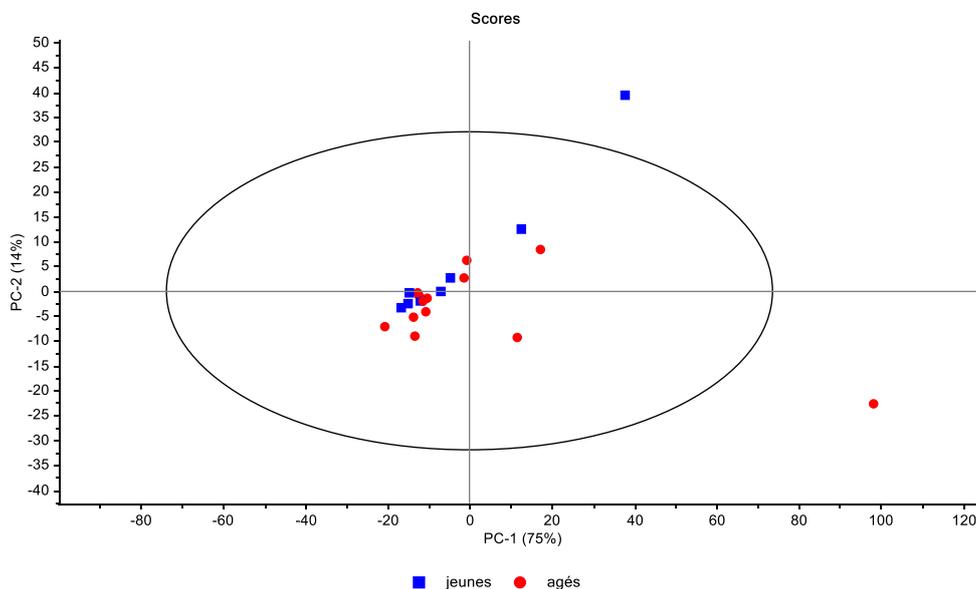


Figure 111: Projection des profils IRTF des échantillons salivaires sur PC1 et PC2 regroupement suivant la classe d'âge (dans la zone 1800-1000 cm^{-1})

Les ACP réalisées en fonction des signes cliniques locaux, les pathologies et la prise de traitements médicamenteux ne permettent pas non plus de discriminer les patients (Annexe 55 à Annexe 59).

La Figure 112 présente les spectres IRTF moyennés de la salive de patients jeunes et âgés dans la zone [1800-900 cm^{-1}].

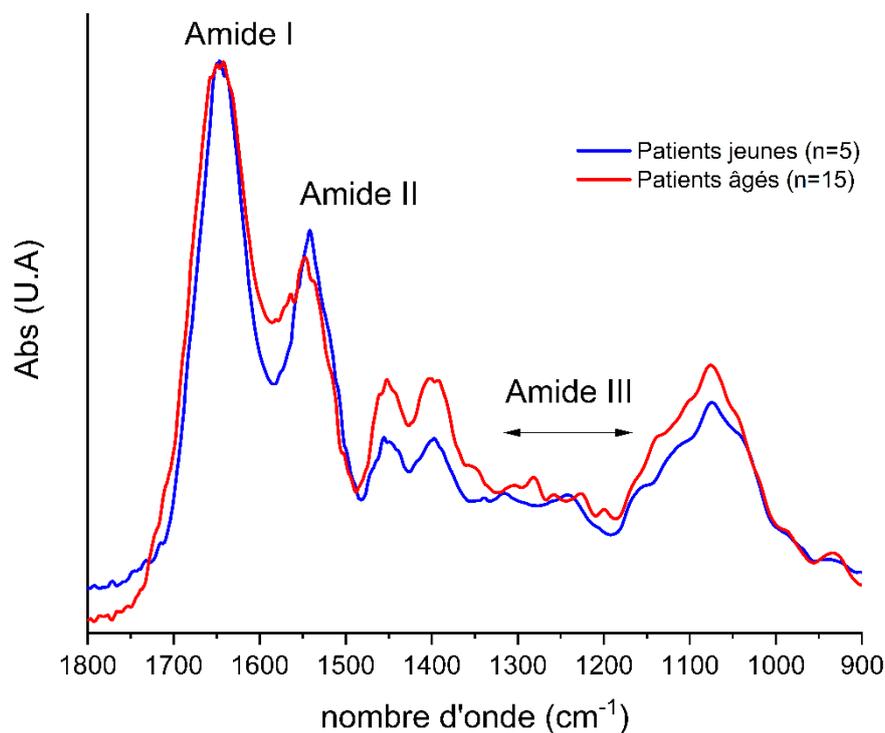


Figure 112: Spectres IRTF moyennés de salive de patients jeunes et âgés (dans la zone 1800-900 cm^{-1})

Nous observons, pour les patients âgés, une importante modification de la réponse vibrationnelle de la salive de la zone [1350-1200 cm^{-1}], zone principalement associée aux amides III des protéines constitutives de la salive et caractéristiques de leurs différentes structures secondaires.

Cette évolution avec l'âge est corroborée par la modification des amides I et II, également très sensibles aux différentes structures secondaires.

En effet, dans la zone des amides I et II (Figure 113), nous observons un élargissement de la bande amide I, un décalage de la bande amide II vers les hauts nombres d'ondes ainsi qu'un dédoublement de cette dernière chez les patients âgés

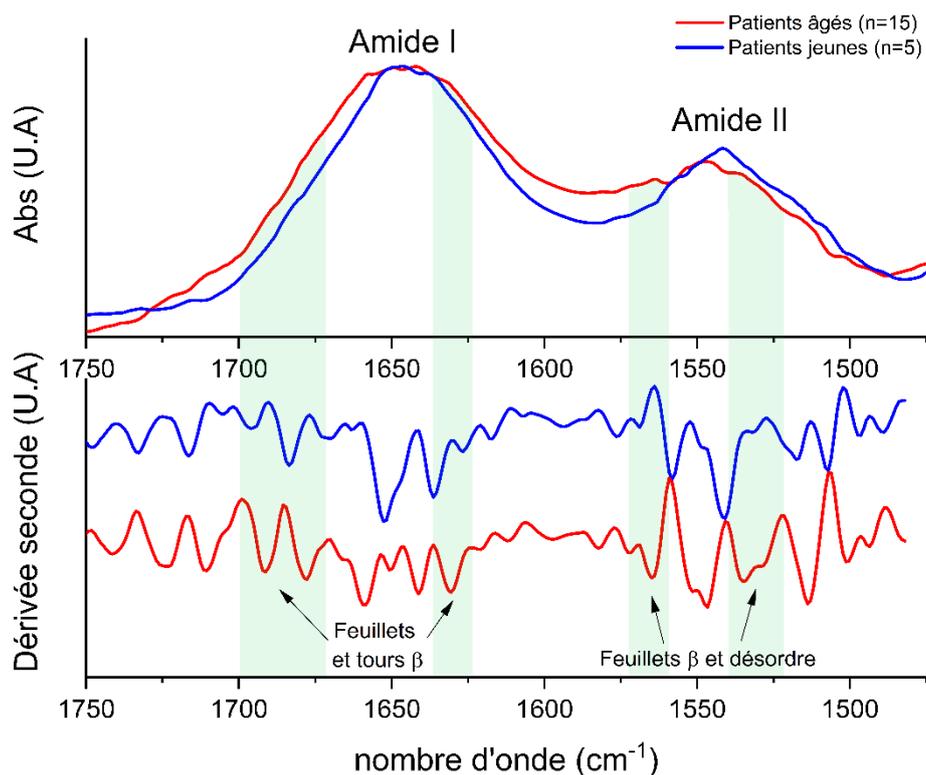


Figure 113: Spectres IRTF moyennés de salive de patients jeunes, âgés, diabétiques et atteints de maladies cardiovasculaires (dans la zone 1750-1475 cm^{-1})

Les spectres dérivées secondes ont mis en évidence l'influence de l'âge sur la structure secondaire des amides I et II (Figure 113). Nous observons la présence de nouvelles bandes pouvant être associées aux structures secondaires en feuillets β et structures désordonnées avec l'âge.

Afin de s'affranchir de la réponse vibrationnelle des amides I et II (très variables en fonction de l'âge) nous avons réalisé une ACP dans la zone d'étude ($2200-1950 \text{ cm}^{-1}$) \cup ($1480-1000 \text{ cm}^{-1}$) dans le but de définir plus finement la discrimination des populations en fonction des pathologies et des traitements médicamenteux.

Malgré la réduction de la zone d'étude de l'ACP, elle ne permet pas de discriminer les patients suivants les variables catégorielles citées précédemment. (ACP réalisée mais non montrée en annexe).

IV.C.3.3 Analyses univariées des marqueurs vibrationnels spécifiques

Compte tenu de l'influence de la modification majeure de la réponse vibrationnelle de la salive des patients sous psychotropes, nous n'avons pas calculé les indicateurs de la salive pour ces patients. En effet, il nous était impossible de relever les aires associées aux bandes d'absorptions indexées dans le Tableau 32 dans ce cas.

Les boîtes de dispersion, la distribution des marqueurs vibrationnels de la salive, les tests d'homogénéité des variances et tests de normalité sont présentés de l'Annexe 60 à l'Annexe 68.

IV.C.3.3.1 Lien entre les marqueurs vibrationnels et la classe d'âge

Il est à noter une diminution significative de la fraction protéique ($p=0.0024$) avec l'âge (Figure 114).

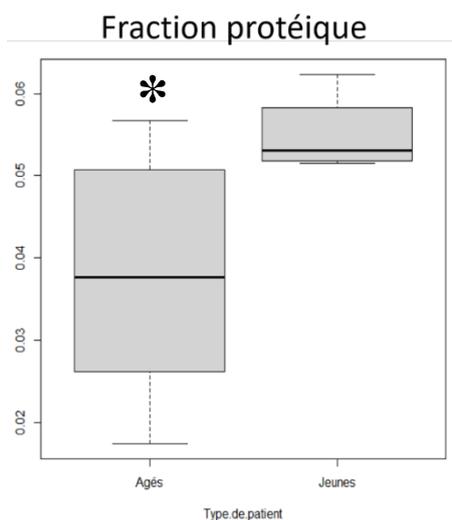


Figure 114: Boîtes de dispersion de l'aire (1540 cm^{-1})/aire ($1700\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) en fonction de la classe d'âge

Nous observons également une diminution significative de l'indicateur « Amide III – a /protéines » ($p=0.04069$) chez les patients âgés (Figure 115).

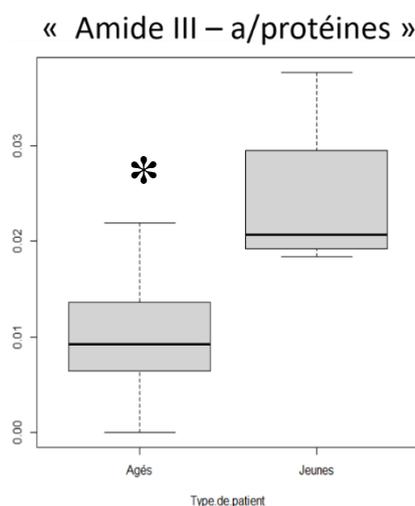


Figure 115: Boîtes de dispersion de l'aire ($1330\text{-}1268\text{ cm}^{-1}$)/aire (1540 cm^{-1}) en fonction de la classe d'âge

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de la salive en fonction de l'âge sont présentées en Annexe 61.

IV.C.3.3.2 Lien entre les marqueurs vibrationnels et les signes cliniques locaux inflammatoires

Nous avons pris soin ici de regrouper les patients atteints de gingivite et ceux présentant des facteurs de risques inflammatoires afin de réduire le nombre de variable catégorielle.

Pour l'ensemble des deux populations, nous observons sur la Figure 116 et Figure 117, respectivement, une diminution de l'indicateur « Composés aliphatiques/protéines » ($p=0.01531$) ainsi qu'une diminution de l'indicateur « Amide III - b /protéines » ($p=0.03482$) au sein de la salive de patients présentant des facteurs de risques inflammatoires ou une gingivite.

« Composés aliphatiques/protéines »

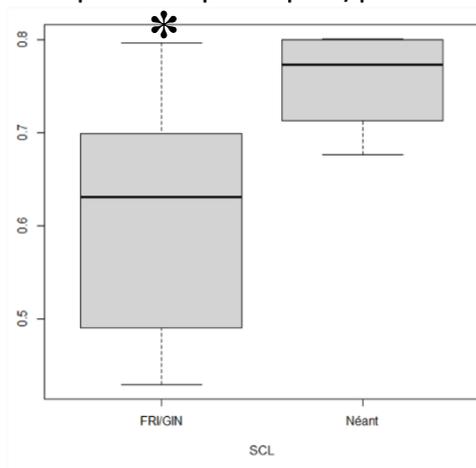


Figure 116: Boîtes de dispersion de l'aire (3000-2800 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction des signes cliniques locaux

« Amide III – b/protéines »

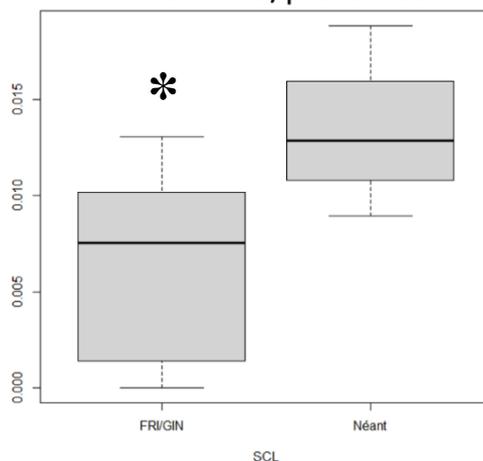


Figure 117: Boîtes de dispersion de l'aire (1270-1190 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction des signes cliniques locaux

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de la salive en fonction des signes cliniques locaux sont présentées en Annexe 62.

IV.C.3.3.3 Lien entre les marqueurs vibrationnels et le score OHAT

Les données vibrationnelles de la salive ne varient pas en fonction du score OHAT (Annexe 63).

IV.C.3.3.4 Lien entre les marqueurs vibrationnels et les pathologies

- Diabète

La Figure 118 présente une diminution significative de la fraction protéique ($p=0.016$) de la salive chez les patients atteints de diabète, **pour l'ensemble des deux populations**.

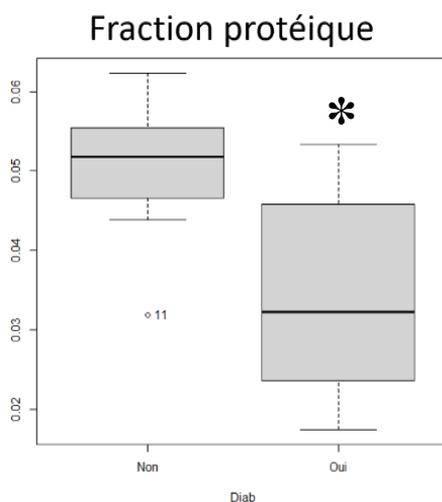


Figure 118: Boîtes de dispersion de l'aire (1540 cm^{-1})/aire ($1700\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) en fonction du diabète

Il est également à noter une augmentation de l'indicateur « Hydrates de carbones/protéines » ($p=0.02704$) chez les patients diabétiques (**au sein deux populations étudiées**) (Figure 119).

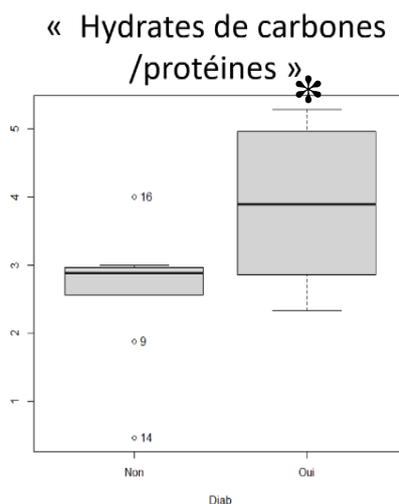


Figure 119: Boîtes de dispersion de l'aire ($1190\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$)/aire (1540 cm^{-1}) en fonction du diabète

Une augmentation de l'indicateur « Hydrates de carbone/protéines ($p=0.03716$) chez les patients diabétiques est confirmée, cette fois-ci **uniquement au sein de la population de patients âgés** (Figure 120).

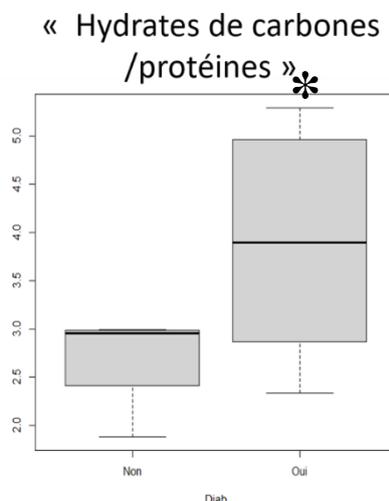


Figure 120: Boîtes de dispersion de l'aire (1190-1000 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction du diabète (pour les patients âgés uniquement)

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de la salive en fonction du diabète sont présentées en Annexe 64.

- Maladies cardiovasculaires

La Figure 121 montre une diminution significative de l'indicateur « Composés aliphatiques/protéines » ($p=0.01685$) de la salive de patients atteints de maladies cardiovasculaires (**pour l'ensemble des deux populations**).

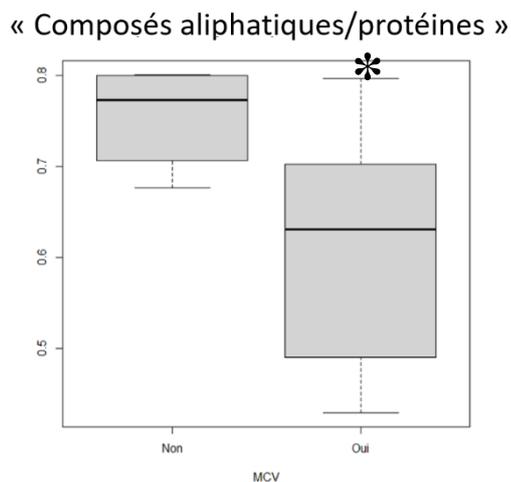


Figure 121: Boîtes de dispersion de l'aire (3000-2800 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction des maladies cardiovasculaires

La Figure 122 présente la diminution significative de l'indicateur « Amide III - a /protéines » ($p=0.01787$) chez les patients atteints ces pathologies (**pour l'ensemble des deux populations**).

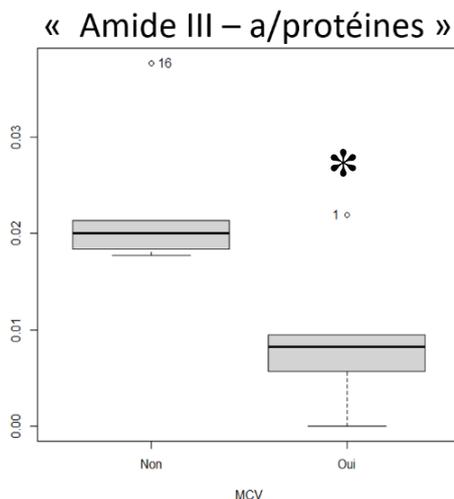


Figure 122: Boîtes de dispersion de l'aire (1330-1268 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction des maladies cardiovasculaires

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de la salive en fonction des maladies cardiovasculaires sont présentées en Annexe 65.

- Troubles psycho-cognitifs

Les données vibrationnelles de la salive ne varient pas en fonction des troubles psycho-cognitifs (Annexe 66).

IV.C.3.3.5 Lien entre les marqueurs vibrationnels et les aux traitements médicamenteux

Les données vibrationnelles de la salive ne varient pas en fonction des traitements des maladies cardiovasculaires (Annexe 67).

En revanche, **pour l'ensemble des deux populations** sous anticoagulants, il est à noter une diminution significative de l'indicateur « Composés aliphatiques/protéines » ($p=0.005831$) (Figure 123).

« Composés aliphatiques/protéines »

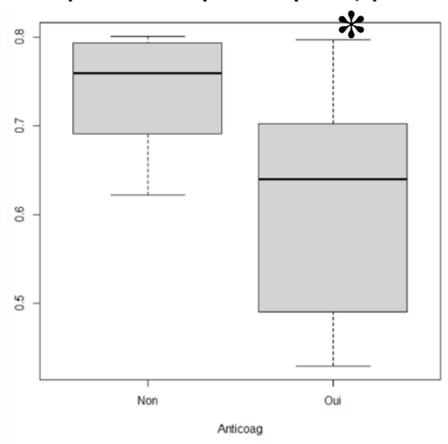


Figure 123: Boîtes de dispersion de l'aire (3000-2800 cm^{-1})/aire (1540 cm^{-1}) en fonction des anticoagulants

Les analyses uni-variées des autres marqueurs vibrationnels de la salive en fonction des anticoagulants sont présentées en Annexe 68.

IV.D Marqueurs mécaniques

Des analyses mécaniques dynamiques en cisaillement ont été réalisées dans le cadre de l'étude clinique. Il s'agit ici de définir s'il existe un lien entre les propriétés viscoélastiques de muqueuses buccales humaines âgées (13 patients) et les données cliniques. La distribution des marqueurs est reportée dans le tableau en Annexe 69.

La Figure 124 présente à titre d'exemple l'évolution du comportement viscoélastique de muqueuses maxillaires et mandibulaires de patients âgés entre 0.01 et 2% de déformation à 37°C et à une fréquence de 1Hz.

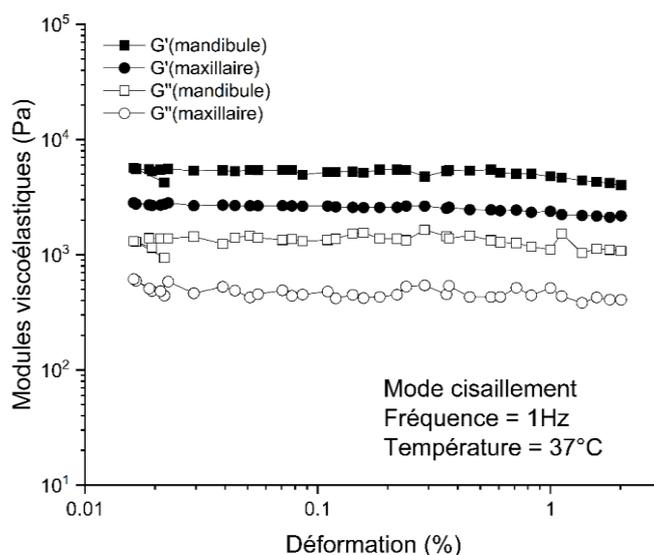


Figure 124: Evolution du module G' en fonction de la déformation d'une muqueuse maxillaire chez les patients âgés

Dans le chapitre III, nous avons déterminé l'influence de la localisation du prélèvement sur le comportement viscoélastique des muqueuses. Comme nous avons pu l'observer sur les muqueuses buccales porcines (Figure 62), nous remarquons qu'à fréquence et déformation donnée, les modules G' et G'' des biopsies mandibulaires humaines sont toujours supérieurs à ceux des biopsies maxillaires humaines. Il convient d'étudier le lien entre les signes cliniques locaux et généraux sur le comportement mécanique des muqueuses pour chaque localisation.

Il est à noter que les valeurs des modules G' et G'' des muqueuses buccales humaines sont très proches de celles relevées pour les muqueuses buccales porcines. L'étude de faisabilité (chapitre III) met de nouveau en évidence la robustesse du protocole de caractérisation à l'échelle structurale.

Nous avons reporté sur la Figure 125, un graphique en bandes présentant l'évolution du module de conservation G' en Pa en fonction des signes cliniques locaux.

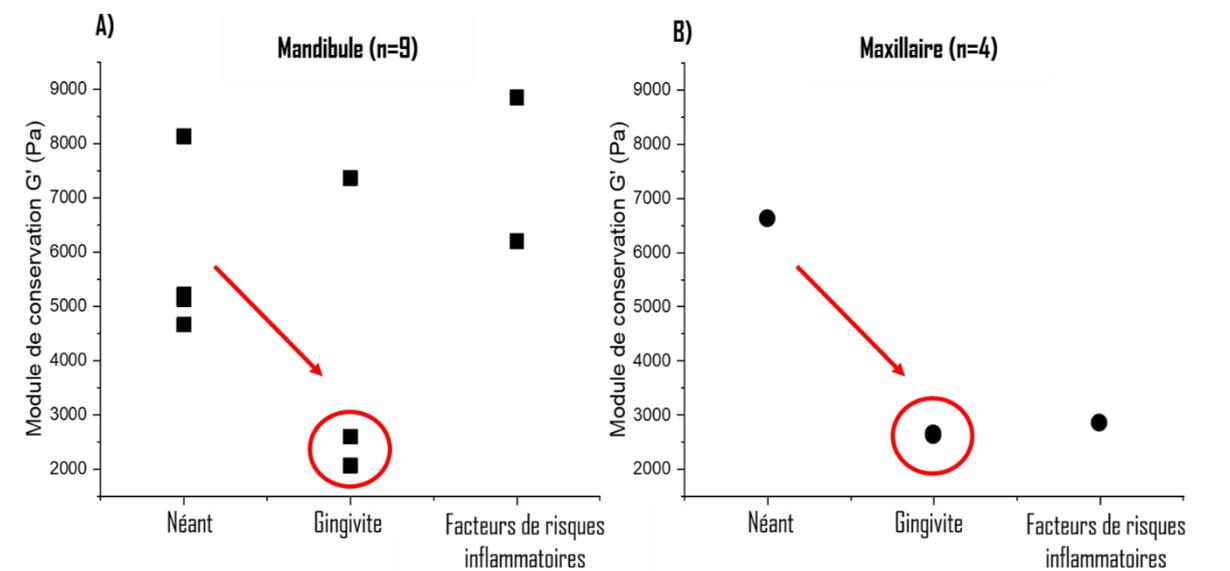


Figure 125: Evolution du module conservatif G' en fonction des signes cliniques locaux au niveau des mandibules (A) et des maxillaires (B)

Malgré le faible nombre d'échantillons, nous observons dans la majorité des cas une **diminution du module G'** chez les patients atteints de **gingivite** (pour les mandibules comme pour les maxillaires).

IV.E Corrélation entre les marqueurs biophysiques et les données cliniques/âge

Il s'agit dans cette partie de discuter et d'expliquer les modifications des marqueurs biophysiques (liés à l'organisation hydrique, la structure et la composition moléculaire de la muqueuse buccale humaine et la composition moléculaire de son biofluide associé) avec les conditions physiopathologiques.

IV.E.1. Réponse à l'objectif principal : évolution des marqueurs liés à l'âge

Le Tableau 34 récapitule les modifications significatives des marqueurs biophysiques avec la classe d'âge.

Tableau 34: Evolution des biomarqueurs avec l'âge

Techniques	Age
ACD <i>Muqueuse</i>	Eau liée ↘
	Eau liée/eau libre ↘
	T _{ONSET} ↘
	T _{MAX} ↘
IRTF-ATR <i>Lamina propria</i>	--
IRTF-ATR <i>Epithélium</i>	--
IRTF-ATR <i>Salive</i>	Fraction protéique ↘ Amide III – a /protéines ↘

Nous avons observé une modification de l'organisation hydrique avec l'âge, à savoir une diminution de la quantité d'eau liée et du rapport eau liée/eau libre. Dans le derme une diminution du rapport eau liée/eau libre avait aussi été mise en évidence pour la peau exposée [1], mais dans ce cas due à une augmentation de la quantité d'eau libre.

Nous avons également mis en évidence une chute significative de la stabilité thermique du collagène de la muqueuse buccale (mesurée par la T_{MAX} et la T_{ONSET}) chez les patients âgés. Les travaux antérieurs sur le vieillissement du derme avaient révélé une diminution significative de la stabilité thermique avec l'âge pour la peau exposée uniquement [1], en faveur d'une déstabilisation et/ou fragmentation de la triple hélice de collagène par clivage protéolytique. Pour les tissus gingivaux (non exposés aux UVs), cette fragmentation et/ou déstabilisation du collagène pourraient être associée à la composante pathologique du vieillissement. L'« inflammaging » est une composante à prendre en compte ; en effet, le profil de la population est celui d'une population gériatrique polypathologique, polymédiquée, avec des maladies inflammatoires chroniques locales et générales.

Le collagène constitue la composante protéique majeure de la *lamina propria* gingivale. Sa fragmentation/déstabilisation peut entraîner la réduction du nombre de ponts d'eau et donc une diminution de la quantité d'eau liée chez ces patients.

D'autre part, les PG et GAG sont à l'origine d'un équilibre hydrique au sein des tissus conjonctifs [221]. Avec l'âge, il est à noter une diminution du nombre de monomères de PG par molécule d'HA. Cela induit une augmentation du nombre de PG isolés (suffisamment sulfatés), réduisant la charge négative globale des chaînes des GAG et entraînant une diminution de la quantité d'eau retenue dans la matrice extracellulaire [222]. Il a également été observé une diminution des liaisons électrostatiques entre le collagène de type I et les PG, perturbant ainsi l'intégrité de la matrice extracellulaire [220].

Ces modifications corroborent la perturbation de la fonctionnalité des différents constituants de la matrice extracellulaire avec le vieillissement en conditions physiopathologiques.

Au niveau salivaire, nous observons une diminution de la fraction protéique pour la population âgée étudiée. Une étude portant sur la quantification des protéines totales par la méthode d'analyse spectroscopique de Bradford [223] a également révélé une diminution de cette composante chez les patients âgés.

Les protéines salivaires telles que les mucines possèdent un rôle important pour le maintien de l'hydratation des muqueuses. De récents travaux rapportent une diminution des mucines chez les patients âgés (> 60 ans) par rapport aux jeunes adultes [224]. En affectant l'hydratation générale de la bouche, la diminution de mucines pourrait aussi être un autre facteur à l'origine de l'altération hydrique de la *lamina propria*.

IV.E.2. Réponse aux objectifs secondaires

- Evolution des marqueurs liés au score OHAT

Le score OHAT augmente avec l'âge. Cependant, nous n'avons pas observé d'évolution des biomarqueurs avec le score OHAT. Cette grille d'évaluation permet d'avoir un aperçu global de la santé orale d'un patient. Utilisée comme outil de repérage de l'ensemble de la cavité buccale, elle ne permet pas de diagnostiquer des pathologies, ni de décrire la sévérité des lésions.

- Evolution des marqueurs liés aux signes cliniques locaux (inflammatoires et sécheresse buccale)

Le Tableau 35 présente les diverses modifications des biomarqueurs en fonction des signes cliniques locaux.

Tableau 35: Evolution des biomarqueurs avec les signes cliniques locaux inflammatoires

Techniques	Signes cliniques locaux
ACD <i>Muqueuse</i>	--
IRTF-ATR <i>Lamina propria</i>	Collagène/protéines ↓ *Collagène/protéines ↓
IRTF-ATR <i>Epithélium</i>	--
IRTF-ATR <i>Salive</i>	Composés aliphatiques/protéines ↓ Amide III – b protéines ↓
AMD <i>Muqueuse</i>	*Module élastique G'(Pa) ↓

**Pour les patients âgés uniquement*

La gingivite est une maladie inflammatoire réversible, qui touche la gencive marginale. Il semble cohérent que nous observions la modification des biomarqueurs uniquement au sein du site inflammatoire (*lamina propria*) et non au sein de l'*épithélium* buccal.

La stabilité thermique du collagène et l'organisation hydrique des muqueuses ne sont pas modifiées avec les signes cliniques locaux inflammatoires. En revanche, une diminution de l'indicateur « collagène/protéines » est observée au sein des tissus gingivaux inflammatoires : la phase collagénique n'est pas altérée en qualité mais en quantité. La chute de la rigidité évaluée par le module élastique G' confirme au niveau fonctionnel cette diminution de la composante collagénique globale.

Dans la littérature, la diminution du réseau collagénique du tissu gingival est associée à la participation de cellules cytotoxiques (principalement les lymphocytes T cytotoxiques) observée au cours de la gingivite et de la parodontite [225] et à celle des métalloprotéases matricielles (en particulier les MMP-1, MMP-9 et MMP-13, dérivées des cellules inflammatoires) [226]. L'implication de ces facteurs dans le processus pathologique peut expliquer l'évolution des différents indicateurs à un stade élevé d'inflammation des tissus gingivaux.

Au sein de la salive, une diminution de l'indicateur « Amide III – b /protéines » est mise en évidence chez les patients présentant de signes cliniques locaux inflammatoires et associé à la diminution du taux d'IgA [218]. Le déclin de la réponse immunitaire face aux agents pathogènes pour ces patients pourrait favoriser l'apparition de gingivite.

Aucun lien significatif n'est observé entre l'organisation hydrique des muqueuses buccales et la sécheresse buccale (Annexe 24). L'item « salive » de la grille d'évaluation OHAT n'est également pas assez précis afin de décrire le degré d'hydratation de la muqueuse dans son intégralité.

- Evolution des marqueurs liés aux pathologies

Le Tableau 36 présente les diverses modifications des biomarqueurs en fonction des pathologies.

Tableau 36: Evolution des biomarqueurs avec les pathologies

Techniques	Pathologies		
	Diabète	Troubles psycho-cognitifs	Maladies cardiovasculaires
ACD <i>Muqueuse</i>	--	Eau liée ↘	*Eau totale ↘ *T _{MAX} ↘
IRTF-ATR <i>Lamina propria</i>	Lipides/protéines ↗ *Lipides/protéines ↗	--	--
IRTF-ATR <i>Epithélium</i>	Amide A/protéines ↘ *Amide A/protéines ↘ *Glycogène et glucose/protéines ↘ Fraction protéique ↗ *Fraction protéique ↗ Acides nucléiques/protéines ↘ *Acides nucléiques/protéines ↘	Glycogène et glucose /protéines ↗ *Glycogène et glucose /protéines ↗	*Glycogène et glucose /protéines ↗
IRTF-ATR <i>Salive</i>	Fraction protéique ↘ Hydrates de carbones /protéines ↗ *Hydrates de carbones /protéines ↗	**NA	Composés aliphatiques /protéines ↘ Amide III - a/protéines ↘

**Pour les patients âgés uniquement*

***Patients sous psychotropes*

- Les patients diabétiques

Dans l'étude menée sur la caractérisation d'explants de peaux de souris pathologiques (diabète de type II), nous avons observé une augmentation de l'indicateur « lipides/protéines » au sein du derme de souris diabétiques. L'obésité, caractérisée par un excès de graisses dans les tissus, est associée au diabète de type II [223]. Il est donc cohérent d'observer une augmentation de la composante lipidique chez les patients diabétiques. Il est à noter que la population étudiée est principalement constituée de patients diabétiques de type II.

Dans la littérature, l'augmentation des températures de dénaturation du collagène (notamment de la T_{MAX}) chez les patients diabétiques suggère une augmentation de la stabilité du réseau induite par les phénomènes de glycation des protéines [227]. Dans le cadre de nos analyses, aucune différence n'est observée au niveau de la stabilité thermique. Cela s'explique sans doute par la stabilisation et la régulation de la glycémie chez les patients diabétiques traités.

Au niveau de l'organisation hydrique, nous avons observé une diminution drastique de la quantité d'eau totale, libre et liée au sein du derme de souris diabétiques. La stabilité du réseau protéique n'ayant pas été perturbé au sein de notre population, il semble cohérent d'observer

un maintien de l'hydratation des muqueuses, chez les patients atteints de diabète et traité pour cela.

En revanche, il est à noter une diminution de l'indicateur associé à l'hydratation de la couche superficielle de la muqueuse. Des études réalisées sur le *stratum corneum* de patients diabétiques ont associé la diminution de l'hydratation de cette couche à l'hyperglycémie rencontrée chez ces sujets [228]. Lors d'une hyperglycémie, l'accumulation du glucose dans le sang augmente la fréquence et le volume des urines chez les patients diabétiques. Cela peut occasionner une perte excessive d'eau, causer une déshydratation importante ainsi que le développement de complications cutanées chez les diabétiques (principalement les xéroses cutanées).

Les kératinocytes expriment l'insuline, régulant le taux de glucose dans l'*épithélium*. L'insuline permet également de stimuler la production et la différenciation des kératinocytes [228]. La diminution de l'expression de l'insuline au sein des *épithélia* chez les diabétiques peut induire une diminution de la prolifération des kératinocytes et donc une diminution globale du taux de glycogène et de glucose comme révélé avec l'indicateur « glycogène et glucose/protéines ».

Des études réalisées sur les cellules épithéliales du cristallin oculaire suggèrent une diminution de la composante en acides nucléiques associée à l'endommagement de l'ADN et donc des cellules chez les patients âgés atteints de cataracte [229]. En effet, l'endommagement cellulaire semblerait se produire lorsque le taux de ROS est anormalement élevé. Au sein de la population étudiée de patients âgés diabétiques, l'hyperglycémie et la production de ROS semblent être étroitement liés [230] induisant la mort cellulaire (traduite dans notre étude par la diminution de l'indicateur « acides nucléiques/protéines »).

Des travaux décrivent également une augmentation des protéines insolubles de l'*épithélium* oculaire pathologique, mais sans mettre en évidence une protéine spécifique [229], ce que nous retrouvons dans notre étude avec une augmentation de la fraction protéique au sein de l'*épithélium*.

- Les patients atteints de troubles psycho-cognitifs

Nous retrouvons chez les patients atteints de troubles psycho-cognitifs une diminution de l'eau liée des tissus épithélio-conjonctifs. Ces troubles sont généralement pris en charge par la prise de traitements médicamenteux. L'action sialoprive de ces traitements affecte l'hydratation de toutes les muqueuses.

- Les patients atteints de maladies cardiovasculaires

La diminution de la stabilité thermique du collagène a été observée pour les patients âgés, et est également notée pour les patients atteints de maladies cardiovasculaires. Ayant corrélé l'âge et ces pathologies, nous pouvons ainsi dire que la fragmentation et/ou déstabilisation du réseau collagénique des muqueuses buccales est liée aux facteurs physiopathologiques.

La diminution de l'indicateur « Composés aliphatiques/protéines » suggère une diminution des composés apolaires au sein de la salive. Différentes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette variation : une diminution de la composante lipidique (induite par une moindre desquamation de l'*épithélium*, riche en composés apolaires tels que les céramides et les phospholipides) ou encore une diminution des protéines salivaires apolaires.

- Evolution des marqueurs liés aux traitements médicamenteux

Le Tableau 37 présente les diverses modifications des biomarqueurs en fonction de la prise de traitements médicamenteux.

Tableau 37 : Evolution des biomarqueurs avec les traitements médicamenteux

Techniques	Traitements médicamenteux		
	Anticoagulants	Psychotropes	Traitements maladies cardiovasculaire
ACD <i>Muqueuse</i>	--	Eau totale ↘	*ΔH ↗
IRTF-ATR <i>Lamina propria</i>	*Lipides /protéines ↗	--	Amide A/protéines ↘ *Amide A/protéines ↘
IRTF-ATR <i>Epithélium</i>	--	--	--
IRTF-ATR <i>Salive</i>	* Composés aliphatiques /protéines ↘	**NA	--

**Pour les patients âgés uniquement*

***Modifications vibrationnelles majeures*

- Les anticoagulants

Une augmentation de l'indicateur « Lipides/protéines » de la *lamina propria* est mise en évidence pour les patients sous anticoagulants. Dans la population étudiée, les patients anticoagulés sont atteints de maladies cardiovasculaires (antécédents d'AVC, d'embolie, hypertension, fibrillation auriculaire...) et/ou de diabète de type II. La plupart présente une dyslipidémie associée. Il est donc cohérent d'observer une augmentation de cet indicateur chez ces patients (comme décrit précédemment pour les patients diabétiques).

Nous avons remarqué une diminution de l'indicateur « Composés aliphatiques /protéines » pour la salive de patients atteints de maladies cardiovasculaires. Généralement sous anticoagulants, il est logique d'observer cette diminution au sein de la salive de ce type de patients.

- Les psychotropes

La salive des patients sous psychotropes est caractérisée par des modifications moléculaires (altération du profil IRTF). Non seulement la quantité est affectée mais aussi la qualité de la salive dans ce cas.

La diminution de la fraction d'eau totale au sein de la muqueuse buccale des patients sous psychotropes confirme le lien entre la sécheresse buccale et la prise de psychotropes. En effet, la prise de ce type de traitement a une influence sur le degré d'hydratation des muqueuses. Le lien entre la xérostomie et l'action sialoprive des psychotropes est connue et largement décrite dans la littérature [231] [232]. La sécheresse buccale est d'autant plus sévère que le traitement est suivi sur le long terme, ce qui est le cas des patients âgés de l'étude, atteints de troubles psycho-cognitifs.

- Les traitements de maladies cardiovasculaires

Il est observé une diminution de l'hydratation des protéines de la *lamina propria* chez les patients traités pour les maladies cardiovasculaires. Cette tendance est encore plus marquée dans le groupe de patients âgés. L'augmentation de l'enthalpie de dénaturation de la muqueuse (caractéristique du nombre de liaisons hydrogène intra-chaines de la triple hélice de collagène de ces patients) suggère l'augmentation des liaisons hydrogène intra-chaine au détriment des ponts d'eau et corrobore cette diminution de l'hydratation des protéines dans la *lamina propria*.

Pour les patients insuffisants cardiaques traités par des diurétiques il n'a pas été observé de modification de la teneur en eau libre des muqueuses.

V. Caractérisation de feuillets dermiques issus de l'ingénierie tissulaires

Notre premier objectif est de vérifier si les feuillets dermiques élaborés par autoassemblage dans l'équipe IDeAS des IMRCP possèdent une signature vibrationnelle et thermique cohérente avec celle du derme humain afin de valider ce modèle d'un point de vue physico-chimique. A cette fin, le protocole développé pour caractériser la muqueuse buccale est adapté à la détermination des indicateurs hydriques, organisationnels et structuraux de ce modèle dermique *in vitro*.

Servant de support aux *épithélia*, le derme et la *lamina propria* sont des tissus conjonctifs respectivement associés à la peau et aux muqueuses. Il est donc intéressant de comparer la composition moléculaire des feuillets dermiques avec celle de la *lamina propria* de la gencive porcine.

Notre deuxième objectif est de suivre l'évolution de marqueurs quantitatifs et structuraux de ces feuillets dermiques après l'application du champ électrique pulsé de type électroporation (sans ajout de molécule thérapeutique) afin d'évaluer l'impact de ces traitements électriques sur le remodelage de la matrice extracellulaire.

V.A Caractérisation et validation du modèle de feuillet dermique

La validation du modèle repose principalement sur la caractérisation de la MEC produite par les fibroblastes dans le feuillet et son homogénéité. Il s'agit donc dans un premier temps d'analyser la composition moléculaire sur chaque face des feuillets dermiques sans traitement physique (condition contrôle).

V.A.1. Composition moléculaire des feuillets dermiques par spectroscopie IRTF en mode ATR

Les feuillets dermiques en condition contrôle sont tout d'abord analysés par la méthode IRTF. L'objectif principal est de vérifier la présence des principaux constituants de la matrice extracellulaire au sein de ces feuillets, ainsi que leur répartition de part et d'autre du feuillet.

V.A.1.1 Définition de biomarqueurs vibrationnels spécifiques des tissus

La Figure 126 présente la superposition des réponses vibrationnelles des feuillets dermiques en condition contrôle (CTRL), du derme humain et de la *lamina propria* de la muqueuse buccale porcine dans la gamme [4000-950 cm^{-1}].

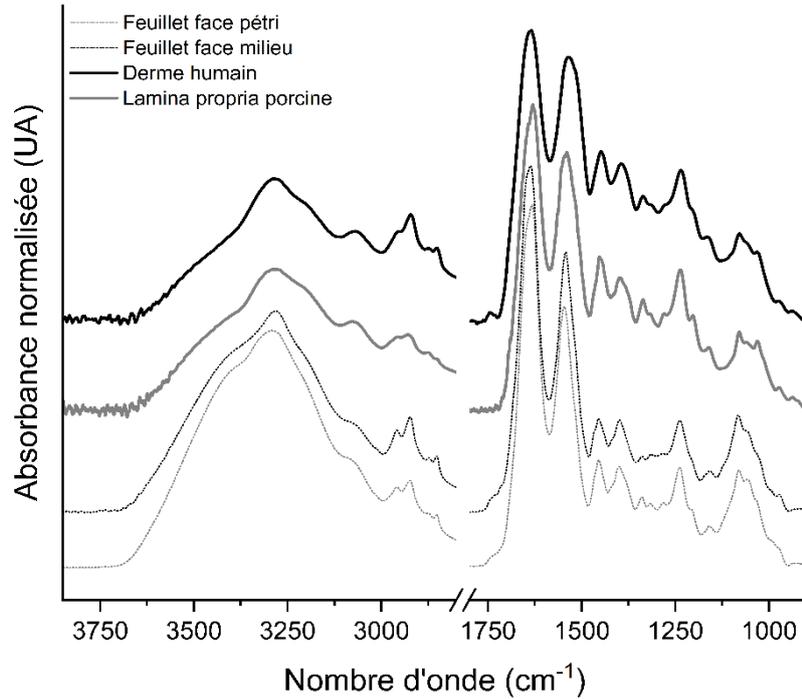


Figure 126: Spectres IRTF-ATR des différents échantillons dans la région [4000-950 cm^{-1}] à l'état déshydraté

Le Tableau 38 répertorie les différentes bandes d'absorptions des feuillets (faces pétri/milieu) et leur indexation la plus probable. A titre de comparaison, nous avons reporté dans ce tableau les positions des bandes d'absorption du derme humain et de la *lamina propria* de la muqueuse buccale porcine. Il est important de noter que seules les positions des bandes d'absorption seront comparées pour ces différents tissus. L'intensité des bandes d'absorption ne sera pas prise en compte dans cette première comparaison, car les différents tissus ne sont pas déshydratés selon le même protocole (lyophilisation pour les échantillons de derme et de muqueuse et déshydratation à l'air ambiant pour les feuillets dermiques). Un accord de plus de 90% est noté entre les spectres moyennés des feuillets dermiques et le spectre du derme humain.

Tableau 38: Indexations des bandes d'absorptions des feuillets dermiques, derme humain et lamina propria porcine

Assignation	Position des bandes /cm ⁻¹		
	Feuillets dermiques	Derme humain	Lamina propria porcine
Amide A : Principalement $\nu(\text{N-H})$ des protéines et $\nu(\text{O-H})$ de l'eau (fortement dépendant de l'hydratation)	[3600-3000] (3300)	[3600-3000] 3283	[3600-3000] 3264
Amide B : Principalement $\nu(\text{N-H})$ des protéines et $\nu(\text{C-H})$ des cycles aromatiques	3080	3070	3074
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ des protéines, lipides	2958	2958	2956
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ des lipides, protéines	2925	2918	2915-2928
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ des protéines, lipides	2870	2872	2874
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ des lipides, protéines	2850	2850	2849
$\nu(\text{C=O})$ des triglycérides, esters de cholestérol, phospholipides	1744	1742	--
Amide I : $\nu(\text{C=O})$ des protéines et $\delta(\text{O-H})$ de l'eau	[1694-1630] (1635)	[1720-1586] (1633)	[1718-1574] (1632)
Amide II : $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$ des protéines	[1558-1481] (1542)	[1586-1479] (1535)	[1574-1479] (1538)
$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ des protéines	1452	1449	1452
$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ des protéines et des lipides	[1401-1393]	[1420-1354]	[1419-1354]
$\delta(\text{CH}_2)$ wagging de la chaîne latérale de la proline (bande spécifique du collagène)	1338	1338	1337
Amide III : $\delta_{\text{plan}}(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C-N})$ des protéines	[1320-1200]	[1313-1183]	[1312-1190]
$\delta(\text{CH}_3)$ spécifique de la MEC (principalement du collagène)	1282	1283	1282
$\delta(\text{C-OH})$ spécifique de la MEC (principalement du collagène)	1205	1201	1207
$\nu(\text{C-O})$ protéines membranaires et hydrates de carbones	1159	1161	1159
$\nu(\text{C-O-C})$ du collagène, glycolipides, protéoglycanes et $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ des phospholipides et acides nucléiques (DNA)	1081	1080	1078
$\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$ des hydrates de carbone	1056	1055	1055
$\nu_{\text{s}}(\text{CO-O-C})$ des résidus d'hydrates de carbone dans le collagène et les GAG	1034	1032	1032
RNA mouvements du cycle d'uracile	990	--	--
DNA/ RNA mouvements du squelette des riboses-phosphatés	970	971	973

Comme précédemment observé sur le derme humain [131] et la *lamina propria* des tissus buccaux [198], l'absorption la plus intense dans la région [3600-3000 cm^{-1}] est associée à l'Amide A, à laquelle se superpose l'Amide B à 3080 cm^{-1} .

La Figure 127 présente les spectres de dérivées secondes des modes d'absorption associés aux vibrations des méthyles et méthylènes dans la zone [3030-2800 cm^{-1}]. Comme précédemment détaillé, les méthylènes sont principalement caractéristiques des composants lipidiques des tissus dermiques, alors que les méthyles sont associés aux lipides mais également aux protéines [160].

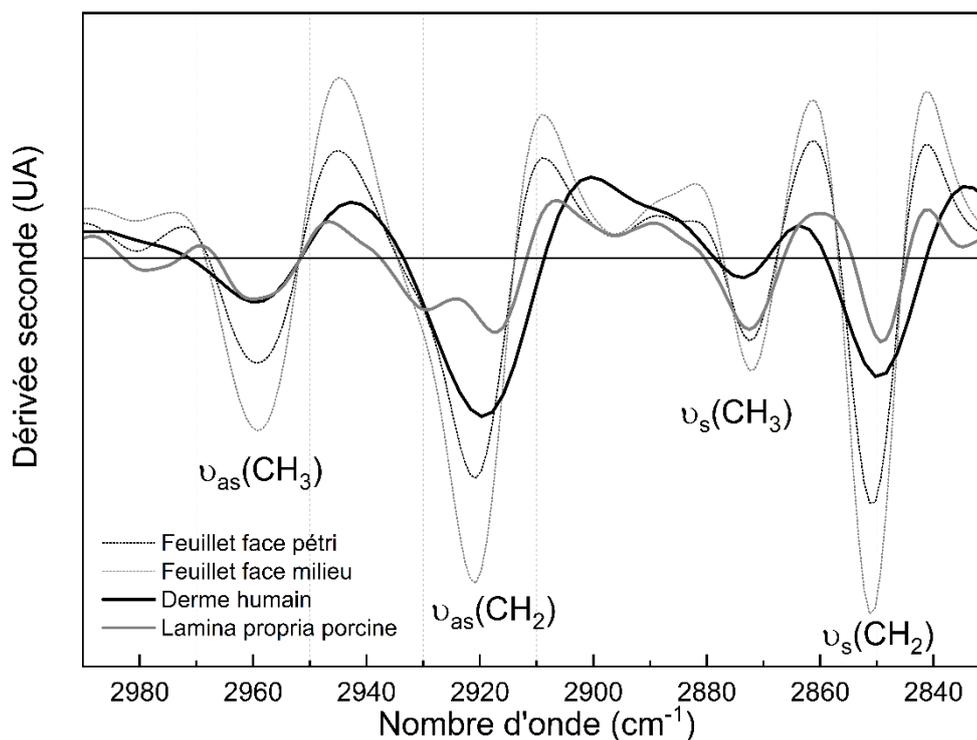


Figure 127: Spectres de dérivées secondes pour les feuillets dermiques, le derme et la lamina propria dans la zone [2980-2840 cm^{-1}]

Dans cette région, les spectres de dérivés seconde permettent ainsi de déceler une bande non visible sur les spectres de bases. Nous retrouvons bien évidemment les bandes d'absorption, intenses, des vibrations d'élongation asymétriques et symétriques des groupes méthyl et méthylène.

Comme observé sur la Figure 126, l'absorption des protéines est représentée par les Amide I et II, respectivement associées aux bandes composites 1635 et 1542 cm^{-1} . La Figure 127 présente les spectres de dérivées secondes de la zone de l'amide I.

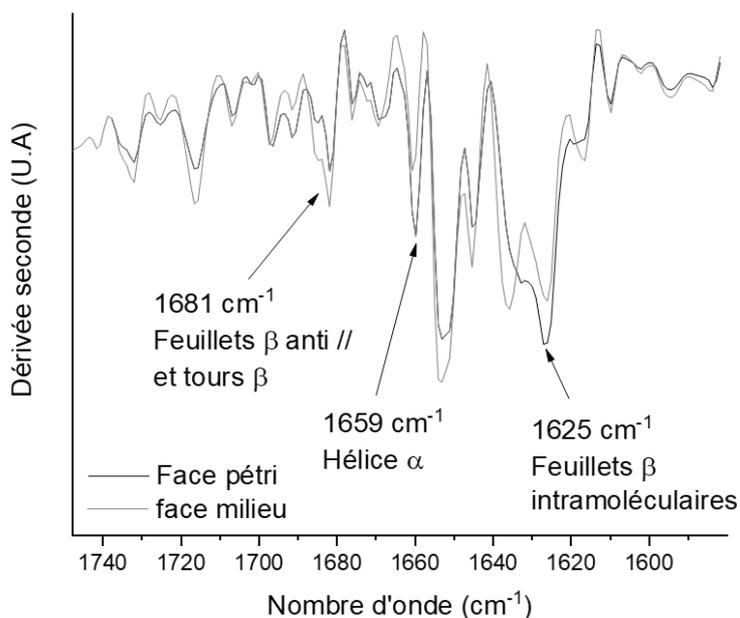


Figure 128: Spectres de dérivées secondes pour les feuillets dermiques, le derme et la lamina propria dans la zone [1740-1550 cm^{-1}]

L'indexation des minimas relevés sur ces spectres, qui correspondent aux différentes structures secondaires des protéines, a été reportée dans le Tableau 39, pour les feuillets dermiques, le derme humain et la lamina propria porcine.

Tableau 39: Indexation des bandes de dérivées secondes des feuillets dermiques, du derme humain et de la lamina propria porcine

Assignations sur l'amide I	Position des bandes / cm^{-1}		
	Feuillets dermiques (face pétri et/ou milieu)	Derme Humain [1]	Lamina propria Porcine
Feuillets β anti-parallèles et tours β	1681	1682	1680
Hélices α	1659	1659	1659
Feuillets β intramoléculaires	1625	1627	1630

Malgré un léger décalage de la bande attribuée aux feuillets β intramoléculaires dans le spectre des feuillets dermiques, les structures en hélices et feuillets sont clairement identifiées et à des positions très similaire à celles relevées pour le derme et la lamina propria.

Principalement attribuée aux protéines, la bande à 1452 cm^{-1} représente un mode de déformation $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$. L'aire de cette bande sera utilisée par la suite dans le calcul des indicateurs des biomarqueurs vibrationnels

L'élargissement de la région [$1400\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$] présentée en Figure 129 correspond à la signature de plusieurs types de constituants tels que les glucides, les protéines et les acides nucléiques. Afin de mieux indexer les bandes associées à la réponse de la phase cellulaire nous avons superposé dans cette zone le spectre IRTF des fibroblastes dermiques humains seuls.

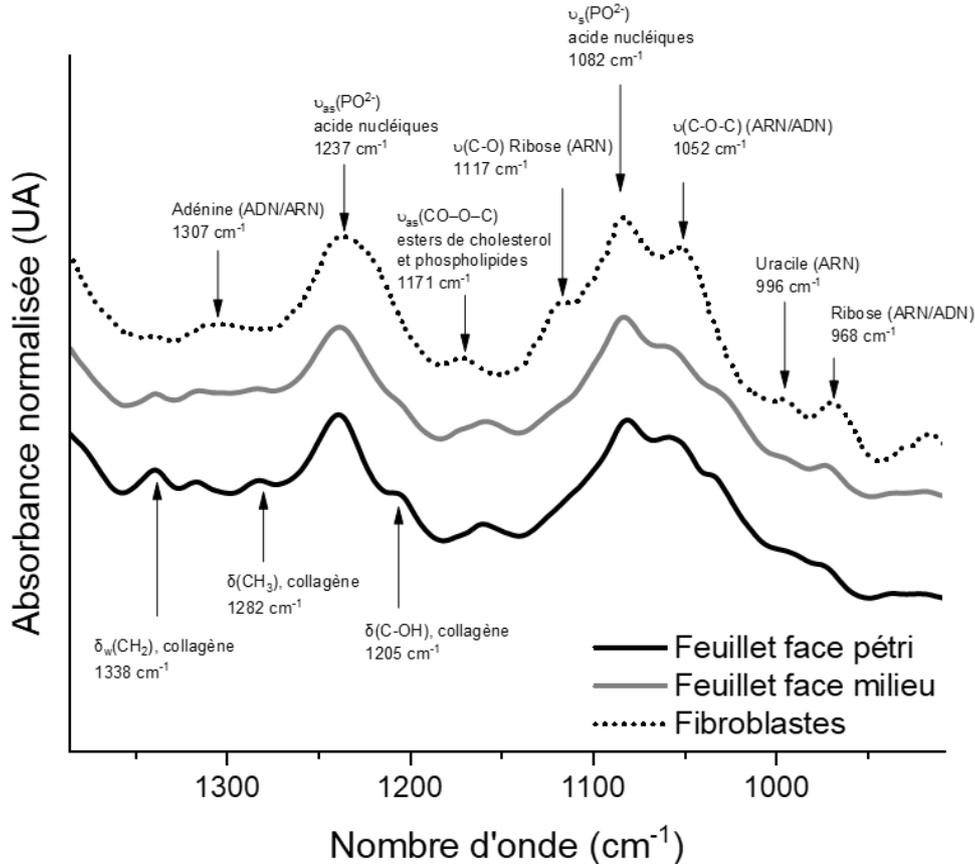


Figure 129: Spectres IRTF des feuillets dermique (face pétri/milieu) et des fibroblastes dans la région [1400-900 cm^{-1}]

Dans cette zone nous pouvons déceler le triplet caractéristique du collagène de type I à 1205, 1238 et 1280 cm^{-1} ainsi que la bande d'absorption de la proline à 1338 cm^{-1} . La présence de ces bandes au sein des feuillets faces pétri et milieu permettent de confirmer la production de collagène par les fibroblastes.

La zone [1180-1140 cm^{-1}] est généralement attribuée aux bandes d'étirements C-O. Cette région spectrale est constituée de deux bandes qui se chevauchent, à savoir les bandes 1171 et 1159 cm^{-1} . La bande 1171 cm^{-1} est associée aux lipides membranaires (tels que les esters de cholestérols et les phospholipides) tandis que la bande 1159 cm^{-1} est associée aux protéines membranaires [233]. Cette dernière est aussi attribuée à l'hydroxyproline du collagène. La bande 1171 cm^{-1} est présente au sein des échantillons de fibroblastes. Nous remarquons une contribution protéique majoritaire au sein des feuillets dermiques.

Dans la région [1140-900 cm^{-1}], les absorptions à 1031 et 1085 cm^{-1} sont attribuées respectivement à $\nu(\text{COOC})$ de résidus d'hydrates de carbone et à $\nu(\text{C-O-C})$ du collagène et des glycoaminoglycane [131]. La bande 1085 cm^{-1} est également associée aux glycogènes et composés phosphatés des acides nucléiques. L'indexation du spectre des fibroblastes seuls, dans la zone [1140-970 cm^{-1}], présentée en Figure 129, permet de mettre en évidence la contribution de la réponse cellulaire sur la réponse spectrale des feuillets dermiques. En effet, cette région représente également le siège des vibrations du cycle uracile de l'ARN (996 cm^{-1}). La présence des bandes 1117, 1052 et 970 cm^{-1} associées aux vibrations des riboses phosphatés

contenus dans l'ARN et l'ADN [168], bien que moins intenses dans les feuillets, ne fait que confirmer la complexité de cette région spectrale.

V.A.1.2 Influence de la face sur la réponse vibrationnelle des feuillets dermiques

Il nous est apparu important de comparer la réponse vibrationnelle des deux faces des feuillets dermiques ; en effet, ensemencés dans la boîte de pétri et mis en culture, les fibroblastes procèdent à l'élaboration de leur propre matrice extracellulaire ; l'environnement peut ainsi avoir un impact sur l'organisation de la matrice, que nous avons cherché à quantifier.

Comme présenté dans la Figure 130, bien que les bandes d'absorption des deux faces soient détectées aux mêmes longueurs d'onde, traduisant la présence des mêmes composants dans les deux cas, des différences d'intensité sont à noter pour certaines bandes d'absorption.

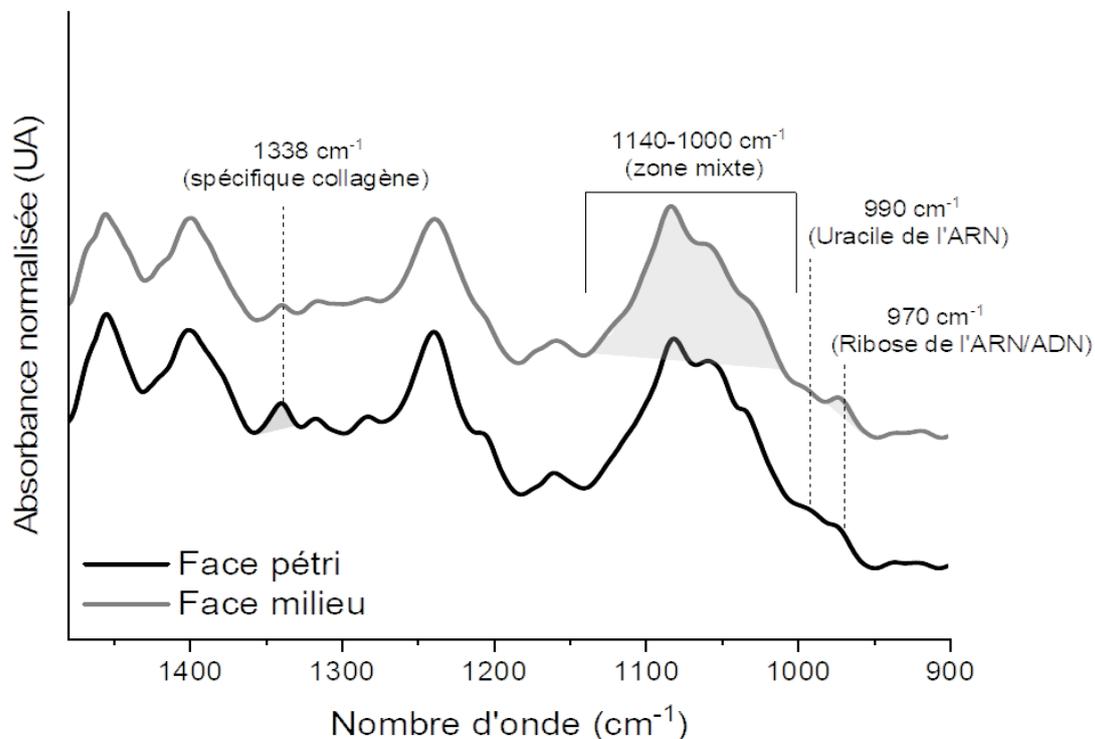


Figure 130: Spectres IRTF-ATR des feuillets dermiques (faces pétri et milieu) dans la région [1400-900 cm-1]

Nous avons donc cherché à quantifier certains des composants bien identifiés, en utilisant comme précédemment des indicateurs associés à des rapports appropriés des aires d'absorbance. Les aires des bandes d'absorption spécifiques ont été calculées à partir du spectre individuel de chaque échantillon puis une analyse statistique des indicateurs a été réalisée. L'indicateur « collagène » a été choisi comme un marqueur associé à la teneur en collagène pour chaque face du feuillet et présenté sur la Figure 131.

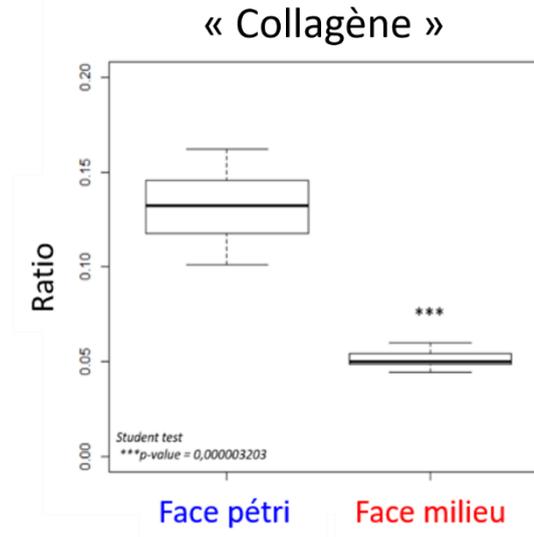


Figure 131: Boîtes de dispersion de l'aire de $A(1338\text{cm}^{-1})/A(1452\text{cm}^{-1})$ en fonction de la face du feuillet

Nous observons que cet indicateur est significativement plus élevé au sein de la face pétri que de la face milieu.

Le rapport entre l'aire du pic 970cm^{-1} et celui de pic 1452cm^{-1} se révèle être un indicateur de la composante cellulaire des feuillets dermiques (que nous nommerons indicateur "ARN-ADN"). Nous avons donc calculé cet indicateur présenté en Figure 132.

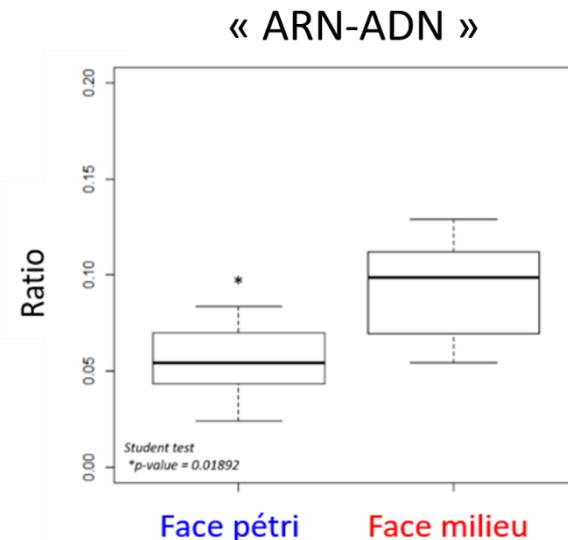


Figure 132: Boîtes de dispersion du ratio $A(970\text{cm}^{-1})/A(1452\text{cm}^{-1})$ en fonction de la face du feuillet

Contrairement à l'indicateur associé au collagène, le marqueur "ARN-ADN/protéines" est significativement plus élevé dans la face milieu que dans la face pétri.

En Figure 133, nous avons enfin calculé le ratio d'aire $A(1140-1000\text{cm}^{-1})/A(1452\text{cm}^{-1})$ que nous nommerons par la suite « zone mixte », et particulièrement sensible aux GAG mais également au matériel cellulaire.

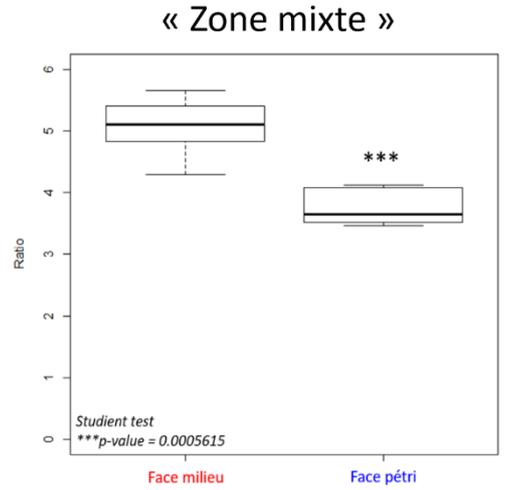


Figure 133: Boîtes de dispersion de l'aire $A(1140-1000\text{ cm}^{-1})/A(1452\text{ cm}^{-1})$ " en fonction de la face du feuillet

Ce troisième indicateur montre une augmentation significative de ce rapport pour la face milieu par rapport à la face pétri. Du fait de la complexité de l'indexation de cette région spectrale, il serait imprudent de n'utiliser que cet indicateur pour la quantification de la composante cellulaire dans les feuillets dermiques.

La Figure 134 montre une coupe transversale d'un feuillet dermique observée par microscopie électronique à transmission (TEM). Cette microscopie corrobore la prédominance de la composante collagénique au niveau de la face pétri ainsi qu'une forte concentration en cellules au niveau de la face milieu.

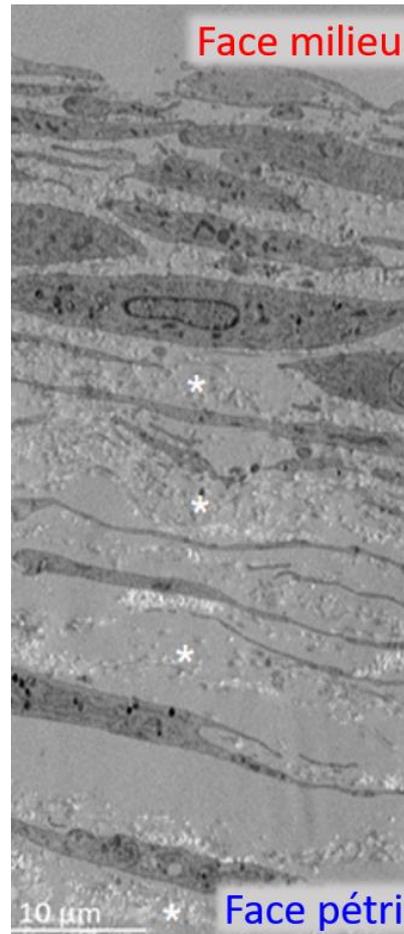


Figure 134: Coupe transversale d'un feuillet dermique observée par microscopie électronique à transmission [234]

Afin de différencier la composition moléculaire de chaque face d'un point de vue de la réponse vibrationnelle globale, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur les spectres IRTF-ATR dans la région $[1500-900 \text{ cm}^{-1}]$ normalisés à l'amide II.

La représentation des spectres individuels dans la base des 3 premières composantes principales est reportée en Figure 135.

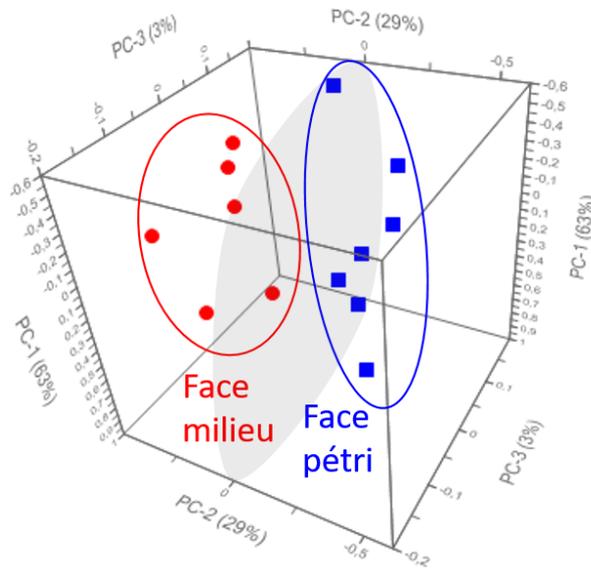


Figure 135: Projection 3D des spectres IRTF des feuillets dermiques sur PC1, PC2 et PC3 suivant la face; échantillons face milieu (ronds rouges) et face pétri (carrés bleus)

Les nuages de points (spectres) peuvent être groupés suivant la face étudiée, et les deux groupes sont clairement discriminés le long de la deuxième composante principale (PC2), qui décrit 29 % de la variation. Cette analyse confirme l'aptitude de l'IRTF à mettre en évidence des différences dans la signature spectrale de chaque face, en raison de leur composition moléculaire distincte.

Nous avons reporté sur la Figure 136 la contribution des variables (les nombres d'onde) sur la deuxième composante principale, discriminante pour la réponse vibrationnelle de la face du feuillet dermique. Ce tracé met en avant les régions spectrales ayant une forte contribution positive ou négative à la composante principale PC2.

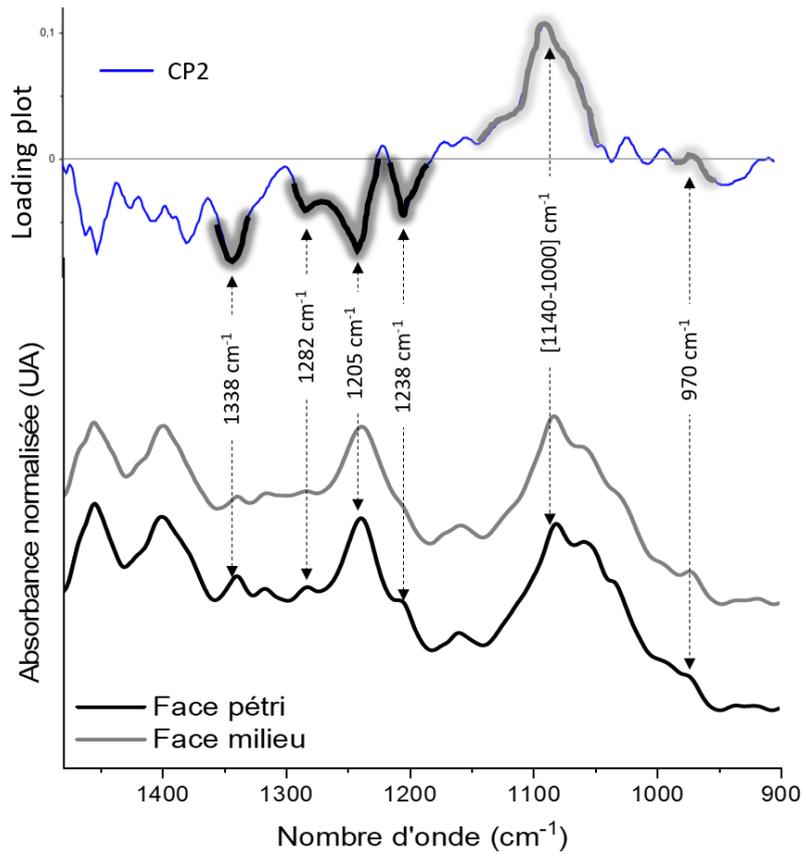


Figure 136: Contribution des variables (nombre d'onde) à la composante principale n°2 pour les échantillons CTRL face pétri et face milieu

Pour cette composante PC2, nous observons des contributions positives importantes de la région spectrale [1140-1000 cm^{-1}] et au niveau de la bande 970 cm^{-1} . Ces régions spectrales ont été préalablement associées à la réponse cellulaire et aux GAG. Ceci est en accord avec les coordonnées PC2 positives des spectres associés à la face milieu (riche en matériel cellulaire) sur la Figure 136.

Nous observons au contraire, pour cette composante PC2, une contribution négative des bandes 1338, 1281, 1238 et 1202 cm^{-1} de la région [1400-1200 cm^{-1}], associées à la signature vibrationnelle du collagène. Cette contribution est tout à fait cohérente avec les coordonnées PC2 négatives des spectres associés à la face pétri (riche en collagène) sur la Figure 136.

Grâce à la technique infrarouge couplée à la méthode ACP, nous avons discriminé les faces des feuillets dermiques. Comme observé par le biais d'analyses histologiques [155], [235], la microscopie électronique à transmission d'une section transversale entière a confirmé ce gradient vertical de cellules et de MEC. Aucune réponse absolue n'a été donnée à ce phénomène, mais nous pouvons dire que les cellules, initialement situées au fond du puit, sécrètent et assemblent la matrice puis vont migrer vers la surface au fur et à mesure qu'elles déposent de la matrice. Les cellules se servent des fibres comme guides pour migrer vers la surface où l'encombrement est moindre et l'accès au milieu nutritif meilleur.

V.A.2. Analyses de la réponse thermique des feuillets dermiques

L'ACD a été utilisée pour détecter les transitions thermiques des feuillets dermiques. A la différence de la technique infrarouge, les feuillets ici sont analysés à l'état hydraté et la réponse thermique correspond à la totalité des feuillets dermiques. Pour obtenir des échantillons de masse suffisante (entre 10 et 30 mg), il a été nécessaire de superposer plusieurs feuillets. Le programme en température est identique à celui précédemment décrit pour la muqueuse porcine et humaine.

La Figure 137 présente le thermogramme ACD d'un ensemble de feuillets dermiques en condition contrôle durant la première remontée en température entre -100 et 85°C.

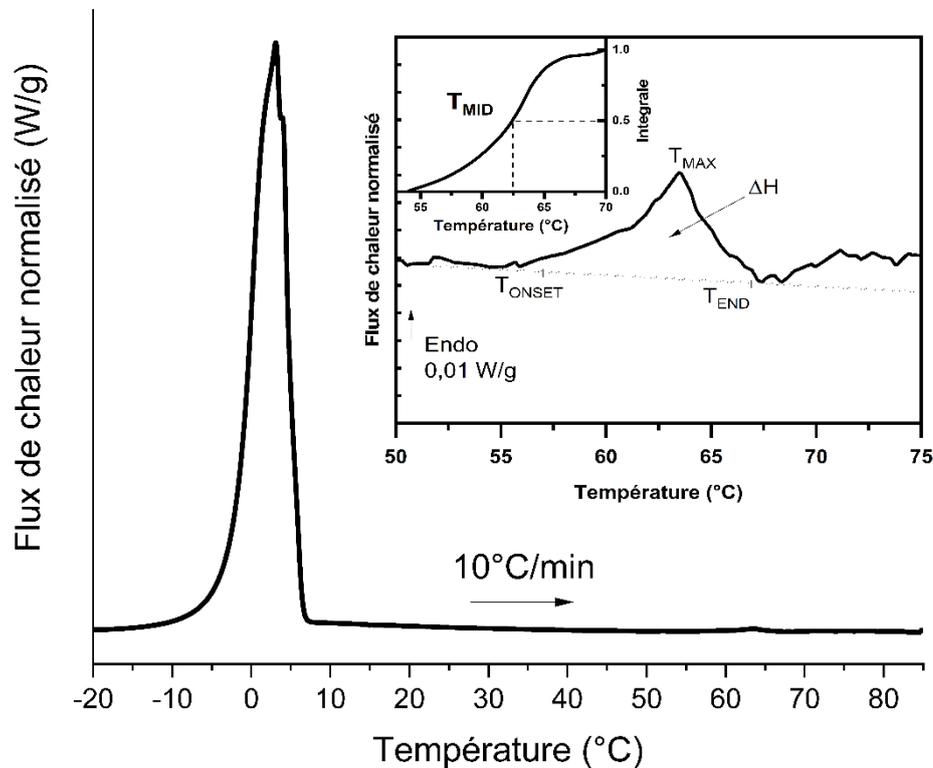


Figure 137: Thermogramme ACD d'un échantillon de feuillet dermique en condition contrôle : chauffe de -20 et 85°C à 10°C/min et agrandissement de la zone [50 -85°C]

V.A.2.1 Organisation hydrique des feuillets dermiques

Comme précédemment observé sur les échantillons de muqueuse [126], [158], le premier événement endothermique intense entre -20 et 10°C correspond à la fusion de l'eau cristallisée au sein des feuillets dermiques.

La quantification de l'eau dite « libre » est alors possible, et par des mesures thermogravimétriques complémentaires, les teneurs en eau « totale » et en eau « liée » ont été déterminées.

Une analyse statistique comparative entre les échantillons de derme humain et les feuillets dermiques en condition contrôle a été réalisée. Les données relatives à l'organisation hydrique des échantillons de derme proviennent des analyses ACD de biopsies de peaux humaines, sur un panel de 5 patients âgés de 20 à 30 ans (données issues du travail de la thèse de Rong Tang). Les trois indicateurs associés à l'eau totale, l'eau libre et l'eau liée sont reportés sur la Figure 138.

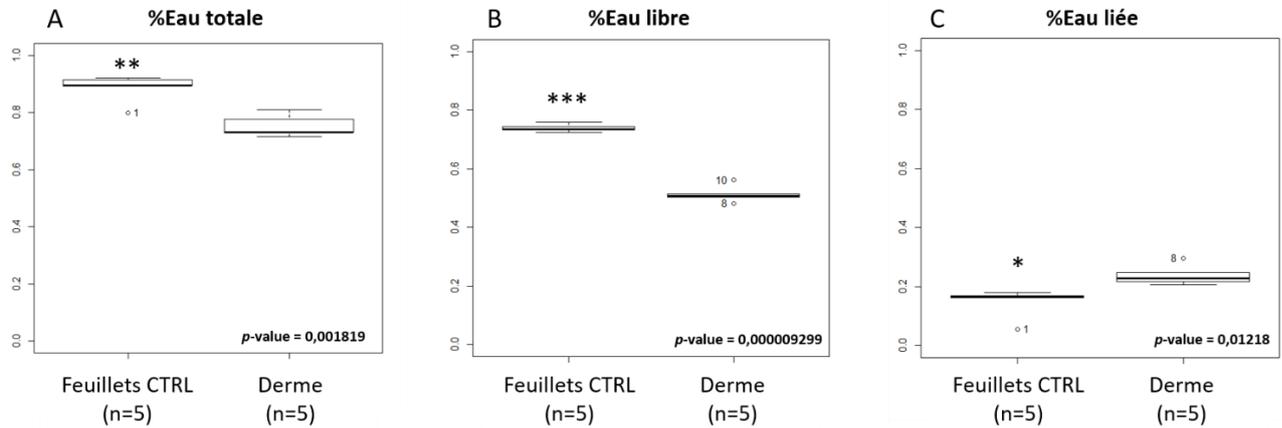


Figure 138: Boîtes de dispersion de la teneur en eau totale (A), la teneur en eau libre (B) et la teneur en eau liée (C) des feuillets dermiques et du derme humain

Les teneurs en eau totale et en eau libre des feuillets dermiques (Figure 138 A et B) sont significativement plus élevées qu'au sein du derme. Au contraire, le pourcentage d'eau liée (Figure 138 C) est plus important pour le derme humain que pour les feuillets. La forte teneur en eau totale et en eau libre peut s'expliquer par le mode de préparation et de stockage des feuillets. En effet, afin de garantir leur développement et leur intégrité, les échantillons sont placés dans un milieu de culture, contrairement aux échantillons de derme qui ont été prélevés, congelés/décongelés puis analysés. Ces fortes teneurs en eau pourraient également être associées à une plus grande proportion de glycosaminoglycanes, dont les propriétés hydrophiles contribuent largement au degré d'hydratation des tissus biologiques [236].

La faible teneur en eau liée au sein des feuillets dermiques peut s'expliquer par une plus faible maturation du réseau protéique de la matrice extracellulaire (et du collagène en particulier, qui est connu pour intégrer de l'eau liée lors de la création de ponts d'eau inter et intra chaînes).

V.A.2.2 Structure physique des feuillets dermiques

Comme observé dans les tissus riches en collagène, le second pic endothermique détecté entre 50 et 85°C sur les thermogrammes ACD (Figure 137) est attribué au phénomène irréversible de dénaturation du collagène.

Comme précédemment décrit, les indicateurs thermiques de la phase collagénique T_{MAX} , T_{ONSET} et T_{MID} , températures caractéristiques de la dénaturation, et ΔHd , l'enthalpie de dénaturation du collagène normalisé à la masse sèche ont été déterminés à partir des endothermes de dénaturation des thermogrammes individuels.

Ces indicateurs sont reportés sur la Figure 139 et la Figure 140 et comparés à ceux déterminés dans le cas du derme humain.

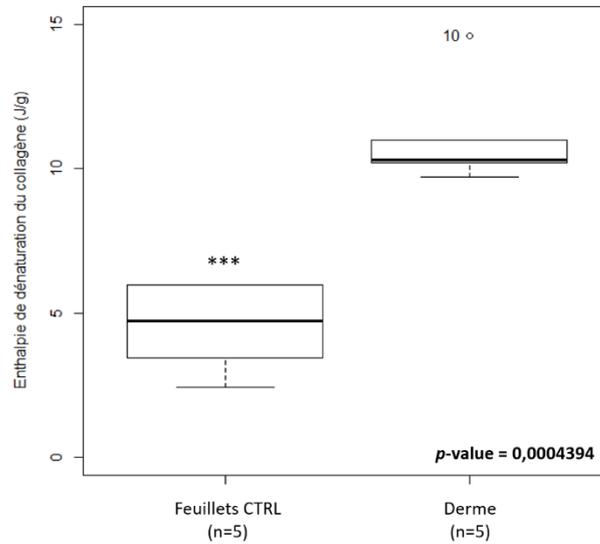


Figure 139: Boîtes de dispersion de l'enthalpie de dénaturation du collagène ΔH_d (derme/feuillets dermiques)

L'enthalpie ΔH_d des feuillets dermiques est significativement plus faible que dans le derme humain, ce qui confirme une plus faible teneur en collagène ou encore une plus faible densité de liaisons hydrogène de ce type de collagène moins mature. Cette variation peut être à rapprocher de la plus faible quantité d'eau liée dans les feuillets dermiques.

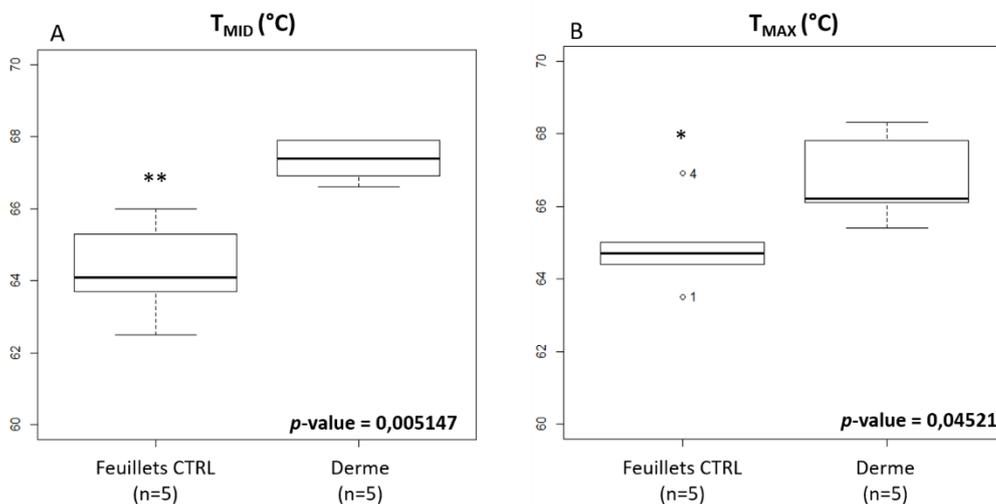


Figure 140: Boîtes de dispersion des températures caractéristiques de la dénaturation du collagène du derme et des feuillets dermiques : T_{MID} (A) et T_{MAX} (B)

Nous observons que T_{MID} et T_{MAX} sont significativement plus faibles pour les feuillets dermiques que pour le derme de la peau de donneurs âgés de 20-30 ans. L'augmentation de la température de dénaturation au sein des tissus biologiques est généralement attribuée à la formation de nœuds de réticulations stable dans le collagène, ce qui traduit un plus faible niveau de maturation du réseau de collagène dans les feuillets comme précédemment évoqué.

V.B Influence des traitements physiques sur les propriétés physico-chimiques des feuillets dermiques

V.B.1. Evaluation des traitements d'électroporation sur la réponse spectrale Infrarouge des feuillets dermiques humains

Les feuillets dermiques sont analysés par IRTF 24 et 48h après l'application des champs électriques de type électroporation. Ces mêmes échantillons sont comparés aux feuillets dermiques en condition contrôle n'ayant pas reçu de traitement.

V.B.1.1 Analyses univariées des indicateurs caractéristiques des feuillets dermiques

Les spectres IRTF-ATR moyennés des feuillets dermiques face pétri et face milieu, après électroporation, sont représentés respectivement sur les Figure 141 A et B dans la région spectrale [1450-950 cm^{-1}].

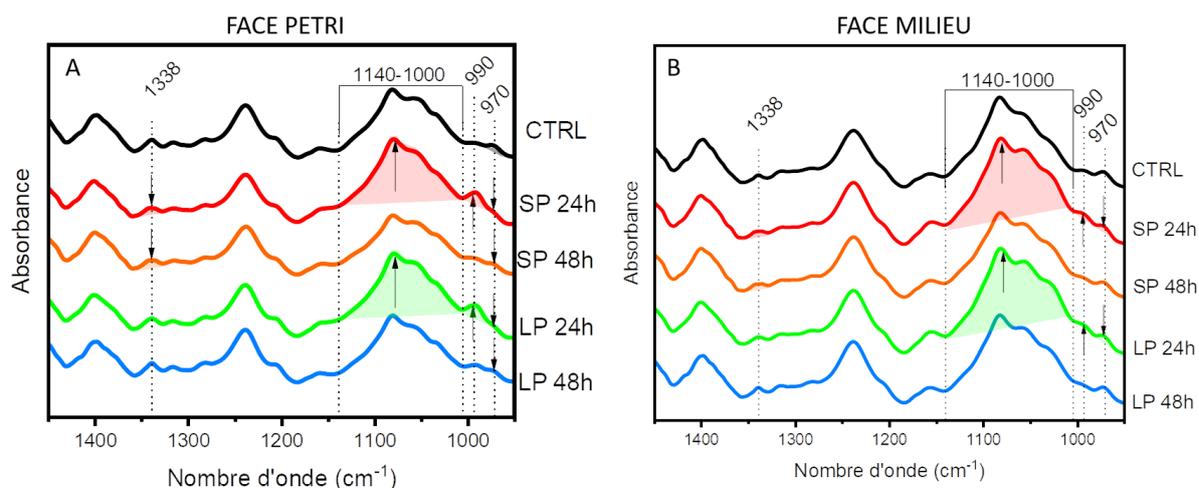


Figure 141: Spectres IRTF-ATR des feuillets dermiques face pétri (A) et face milieu (B) avec/sans traitement physique dans la région spectrale [1450-900 cm^{-1}]

Il est tout d'abord à noter que l'électroporation n'entraîne pas d'altération majeure de la signature spectrale des feuillets : les bandes d'absorptions relevées dans ces nouvelles conditions sont observées au même nombre d'ondes que dans les conditions contrôles.

Néanmoins, des changements mineurs sont détectés sur les intensités de certaines de ces bandes, pour les faces milieu comme pour les faces « pétri ». Les indicateurs correspondants sont présentés ci-après.

Afin de suivre l'évolution de la composante cellulaire vis-à-vis du traitement, le ratio $A(990 \text{ cm}^{-1}) / A(1452 \text{ cm}^{-1})$ associé à l'indicateur « ARN-ADN » est présenté en Figure 142.

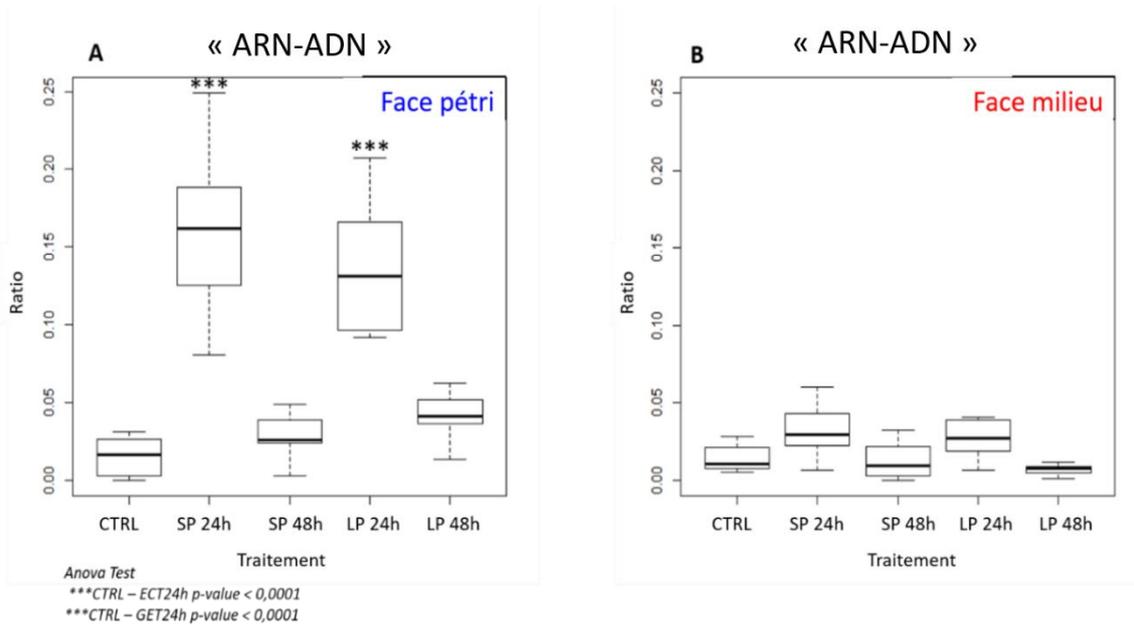


Figure 142: Boîtes de dispersion du ratio $A(990\text{ cm}^{-1})/A(1452\text{ cm}^{-1})$ pour les feuillets dermiques dans différentes conditions : face pétri (A) et face milieu (B)

Pour l'indicateur "ARN-ADN", une augmentation significative est mise en évidence pour la face « pétri » des feuillets 24h après l'électroporation (SP et LP) ; l'équilibre est rétabli 48h après l'application des champs électriques de type électroporation (Figure 142 A). En revanche, aucune évolution significative de cet indicateur n'est observée pour la face « milieu » avec les traitements (Figure 142 B).

L'analyse transcriptomique (Figure 143) réalisée par l'équipe iDeAS, permet de quantifier les gènes modulés après l'application des champs électriques.

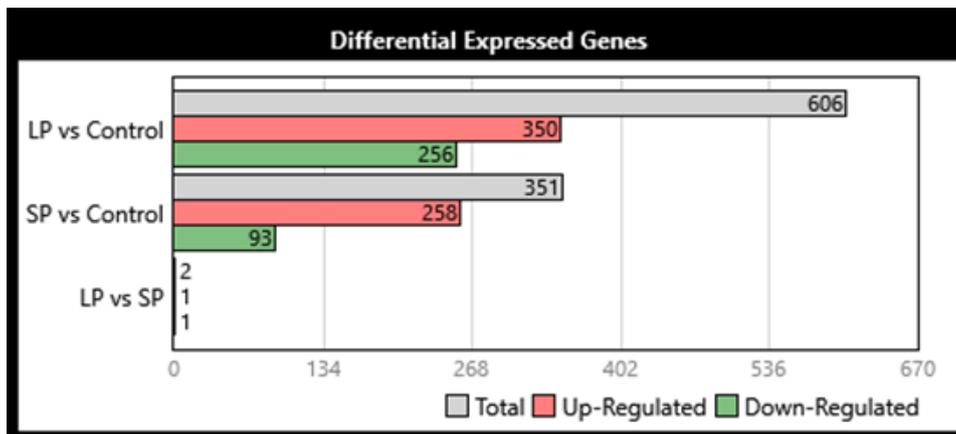


Figure 143: Expression des gènes 4h après l'électrostimulation des feuillets contrôle (CTRL), protocoles d'impulsions longues (LP) et d'impulsions courtes (SP), mesurés par analyse transcriptomique à l'aide d'une matrice Clariom S Affymetrix [234]

Ces données montrent que l'expression de 606 gènes a été modulée 4h après le protocole LP et 351 après le protocole SP. De plus tous les gènes régulés par le protocole SP se retrouvent dans ceux régulés par le protocole LP. Ces résultats apparaissent cohérents avec l'augmentation de l'ARN détectée par IRTF 24h après les traitements d'électroporation et confirment que

l'application d'un champ électrique de type électroporation influence l'expression génique des cellules dans le feuillet dermique.

La Figure 144 présente les indicateurs "Zone mixte " pour chaque face des feuillets dermiques.

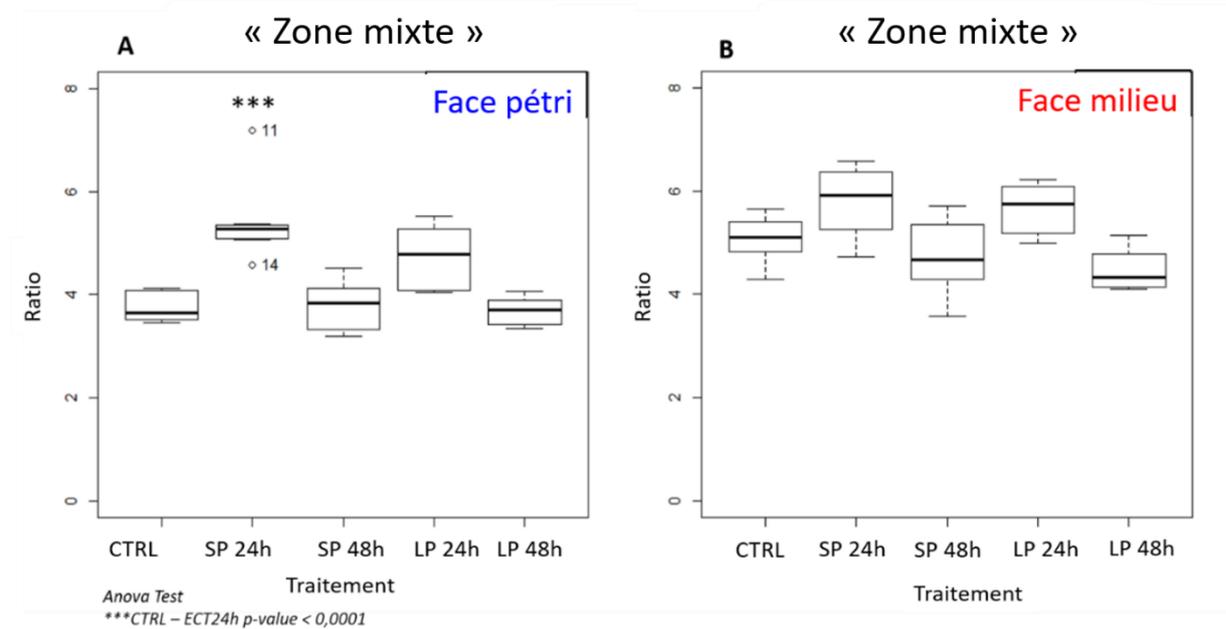


Figure 144: Boîtes de dispersion du ratio $A(1140-1000 \text{ cm}^{-1})/A(1452 \text{ cm}^{-1})$ pour les feuillets dermiques dans différentes conditions : face pétri (A) et face milieu (B)

Il est ainsi à noter une augmentation significative de l'indicateur "Zone mixte " préalablement associée majoritairement à la composante cellulaire et aux GAG, pour la face petri des feuillets dermiques 24 heures après l'électroporation SP ; l'équilibre est rétabli 48 heures après le traitement par SP (Figure 144A). Malgré une tendance à l'augmentation de cet indicateur 24h après électroporation, aucune évolution significative de cet indicateur n'est observée (Figure 144) pour la face milieu de ces feuillets après les traitements électriques.

La Figure 145 présente l'évolution de l'indicateur « collagène » des feuillets dermiques avant et après électroporation.

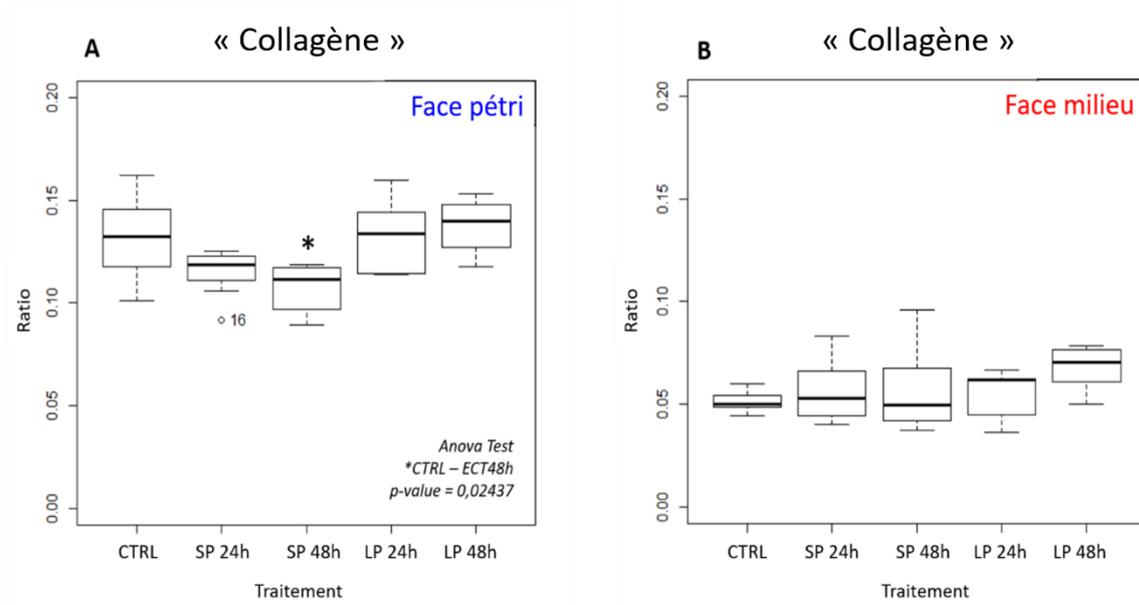


Figure 145: Boîtes de dispersion du ratio $A(1338\text{ cm}^{-1})/A(1452\text{ cm}^{-1})$ pour les feuillets dermiques dans différentes conditions : face pétri (A) et face milieu (B)

Une diminution de cet indicateur spécifique au collagène est constatée 48h après l'électroporation SP (Figure 145A) au sein de la face riche en MEC des feuillets dermiques. En revanche, aucune évolution significative n'est détectée avec le traitement pour la face milieu riche en cellules (Figure 145B).

Le dosage chimique de l'hydroxyproline réalisé par l'équipe IDeAS dans la totalité du tissu est une méthode directe permettant de quantifier la teneur globale en collagène au sein des tissus. Les résultats de ces dosages sont présentés en Figure 146.

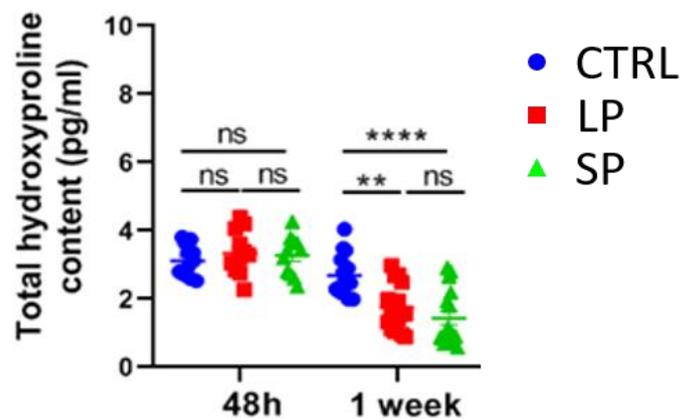


Figure 146: Quantification de l'hydroxyproline 48h et 1 semaine après traitement par électroporation ; feuillets contrôle (ronds bleus), LP (carrés rouges) et SP (triangles verts) [234]

Nous observons premièrement que la quantité de collagène n'est pas significativement modulée 48h après l'application des champs électriques de type électroporation. Deuxièmement, on mesure très clairement une diminution de la quantité d'hydroxyproline une semaine après les traitements LP et SP, ce qui pourrait corroborer la diminution de l'indicateur IRTF associé au collagène.

Des analyses transcriptomiques présentées en Figure 147 ont aussi été réalisées par l'équipe IDeAS dans le but d'observer la modulation des ARNm associés aux gènes codant la famille des collagènes de la MEC dans les feuillets dermiques 4h après l'électroporation.

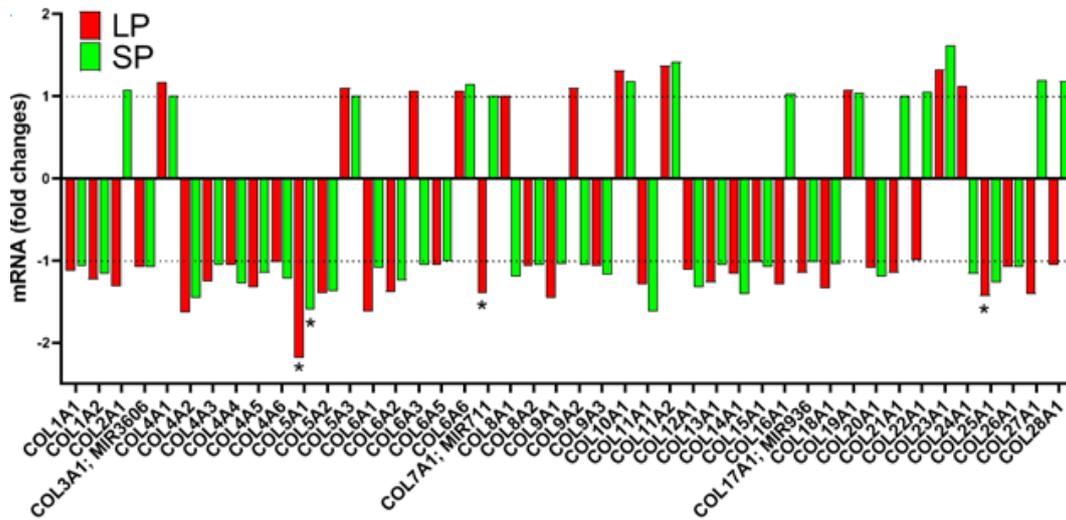


Figure 147: Modulation de l'ARNm de l'ensemble des membres de la famille du collagène 4h après l'électrostimulation du tissu dermique [234]

La tendance générale est en faveur d'une diminution de l'expression des collagènes, ce qui est en accord avec la diminution de l'indicateur IRTF associé au collagène après l'électroporation SP.

Il est à préciser cependant que le traitement par électroporation LP n'entraîne pas la diminution de l'indicateur spécifique du collagène déterminé via la méthode IRTF, ce qui souligne probablement une variation dans les mécanismes cellulaires de réponse à l'électroporation selon le protocole appliqué.

V.B.1.2 Analyses multivariées des échantillons avant et après traitement SP

Afin de mettre en évidence la variation de la composition moléculaire après traitement par électroporation SP, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur les spectres IRTF-ATR normalisés à la bande 1452 cm^{-1} , dans la région $[1480-850\text{ cm}^{-1}]$.

La représentation graphique de l'ensemble des spectres IRTF des feuillets face pétri avant et après traitement SP dans la nouvelle base des 2 premières composantes principales est reportée sur la Figure 148.

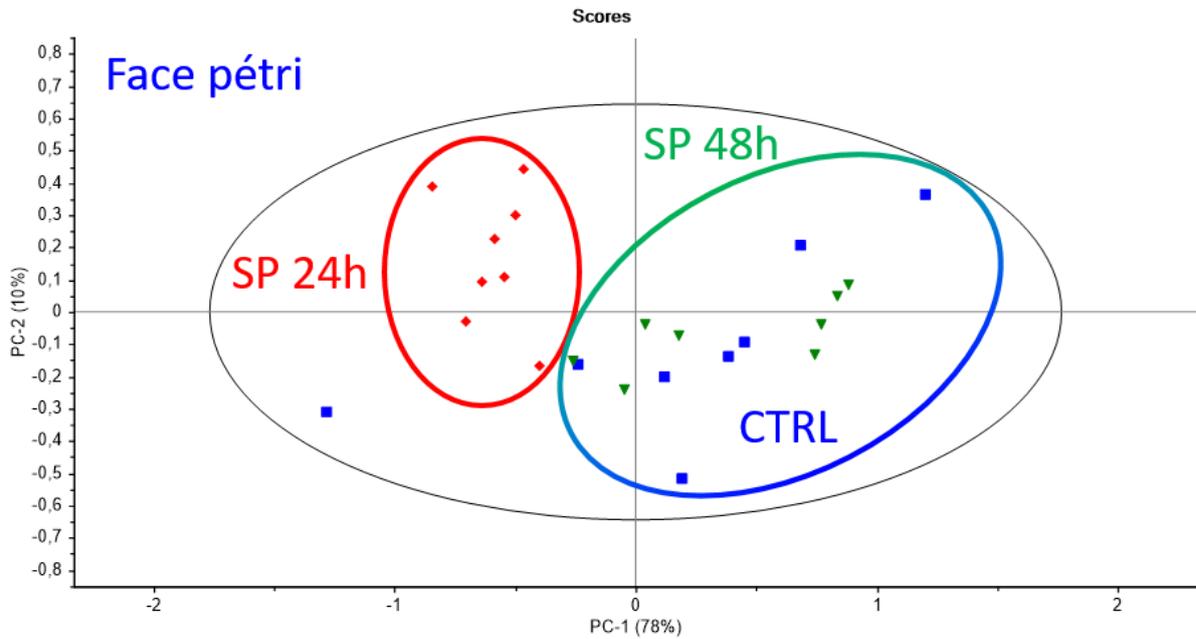


Figure 148: Projection des profils IRTF des feuillets dermiques face pétri sur PC1 et PC2 regroupement suivant le traitement SP ; feuillets contrôle (carrés bleus), SP24h (ronds rouges) et SP48h (triangles verts)

Cette première représentation permet de discriminer les feuillets contrôle des feuillets analysés 24h après électroporation SP selon l'axe PC1 qui contribue à 78% de la variance totale. Nous observons que les spectres des feuillets étudiés 48h après électroporation SP se retrouvent dans la même zone que les feuillets condition contrôle, indiquant un retour à l'équilibre de la réponse vibrationnelle dans la gamme étudiée.

Nous avons reporté sur la Figure 149 la contribution des variables (les nombres d'onde) sur l'axe PC1, discriminant pour la réponse vibrationnelle des échantillons traités.

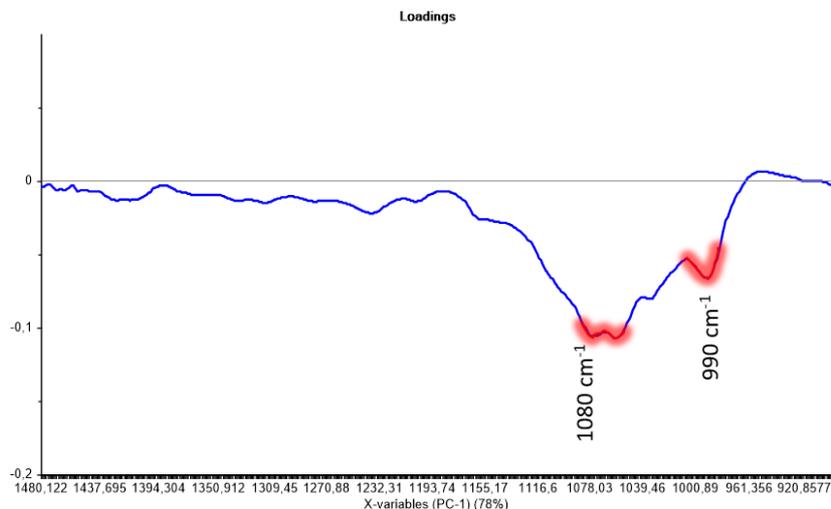


Figure 149: Contribution des variables suivant PC1 pour les échantillons face pétri, traités et contrôle

Pour cette composante PC1, nous observons une contribution négative importante de la région spectrale [1180-960 cm^{-1}], et tout particulièrement pour les bandes 1080 et 990 cm^{-1} , associées principalement à la réponse cellulaire. Les analyses multivariées associées aux bandes

comprises dans la région spectrale [1180-960 cm^{-1}], corroborent l'augmentation des indicateurs univariés de la « zone mixte » et de « l'ARN-ADN » précédemment calculés. En effet, nous avons constaté une augmentation de ces indicateurs 24h après traitement puis un retour à l'équilibre 48h après traitement.

La représentation graphique de l'ensemble des spectres IRTF des feuillets face milieu avant et après traitement SP dans la nouvelle base des 2 premières composantes principales est reportée sur la Figure 150.

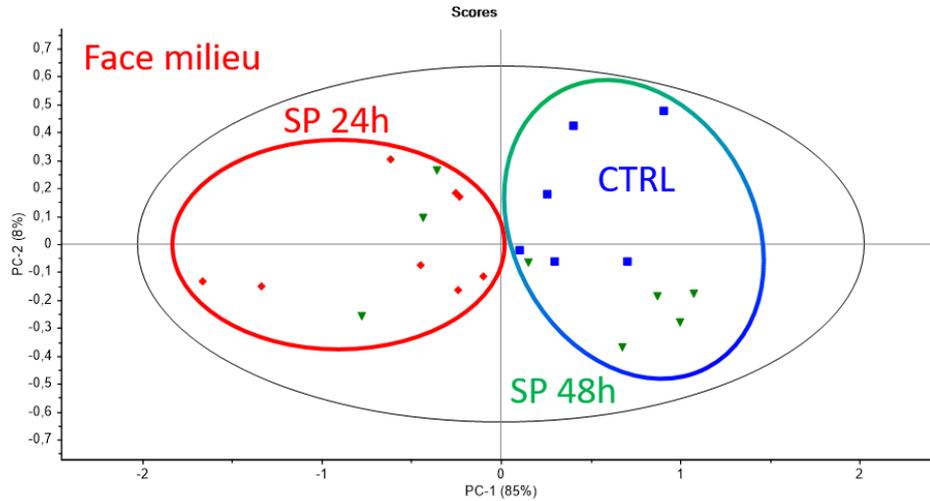


Figure 150: Projection des profils IRTF des feuillets dermiques face milieu sur PC1 et PC2 regroupement suivant le traitement SP; feuillets contrôle (carrés bleus), SP24h (ronds rouges) et SP48h (triangles verts)

Comme pour la face « pétri », cette projection permet de nouveau de distinguer la discrimination entre les feuillets contrôle et analysés 24h après électroporation SP le long de l'axe PC1 qui contribue à 85% de la variance totale.

Comme précédemment, un retour à l'équilibre de la réponse spectrale dans cette gamme est mis en évidence pour les feuillets analysés 48h après traitement SP.

La contribution des variables à la composante PC1, discriminant la réponse spectrale de la face milieu des feuillets contrôle et 24h après électroporation SP est présentée en Figure 151.

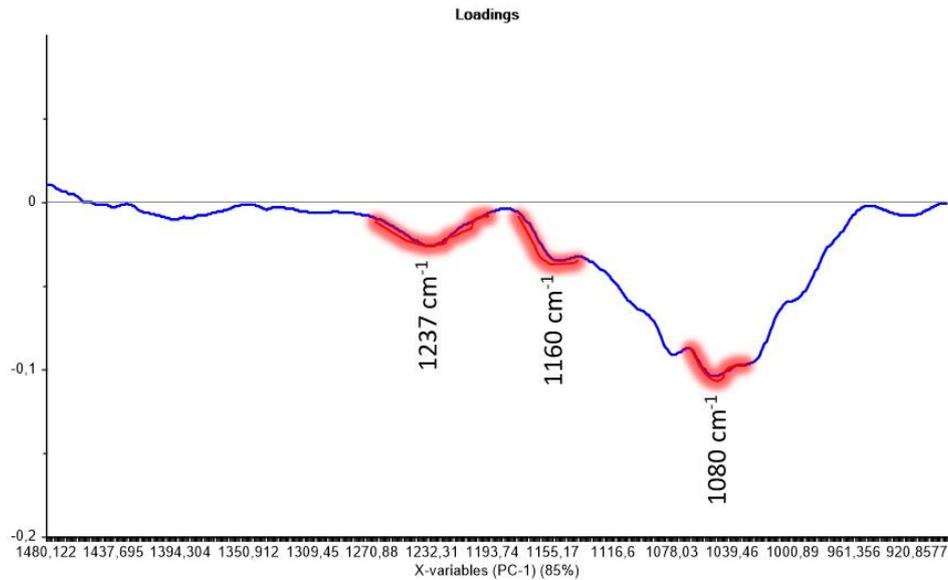


Figure 151: Contributions des variables suivant PC1 pour les échantillons traités par électroporation SP au sein de la face milieu

Par rapport à la face pétri, nous remarquons également, dans la région [1270-960 cm^{-1}], de nouvelles contributions négatives. En effet, il semblerait y avoir une évolution des bandes 1237 et 1160 cm^{-1} , bandes caractéristiques des composés phosphatés des acides nucléiques et du collagène, 24h après traitement SP.

L'indicateur univarié de la « zone mixte », pour les échantillons SP face milieu, a montré une tendance (non significative) à l'augmentation de celui-ci 24h après traitement suivi d'un retour à l'équilibre 48h après traitement.

Nous remarquons également par rapport à l'axe PC1 de la face pétri, l'absence de la contribution négative du pic 990 cm^{-1} . Cela confirme la non significativité de l'évolution de l'indicateur « ARN-ADN » au sein de la face milieu.

V.B.1.3 Analyses multivariées des échantillons avant et après traitement LP

La représentation graphique de l'ensemble des spectres IRTF des feuillets face pétri avant et après traitement LP dans la nouvelle base des 2 premières composantes principales est reportée sur la Figure 152.

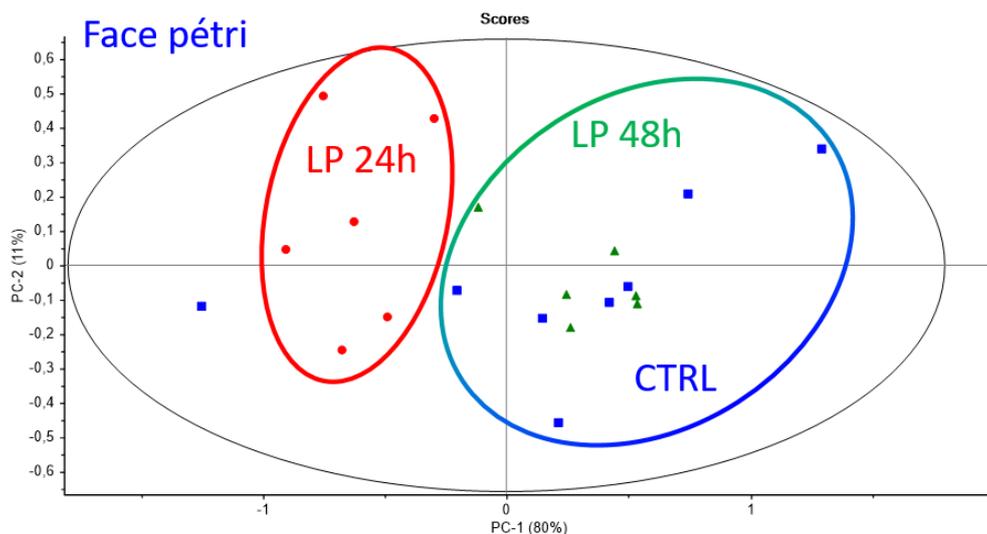


Figure 152: Projection des profils IRTF des feuillets dermiques face pétri sur PC1 et PC2 regroupement suivant le traitement LP; feuillets contrôle (carrés bleus), LP24h (ronds rouges) et LP48h (triangles verts)

Comme le traitement SP, le traitement par électroporation LP conduit à une discrimination similaire des profils IR des feuillets contrôle et des feuillets analysés 24h après traitement. De même, 48h après électroporation LP, un retour à l'équilibre est mis en évidence.

La contribution des variables à la composante PC1 est présentée en Figure 153.

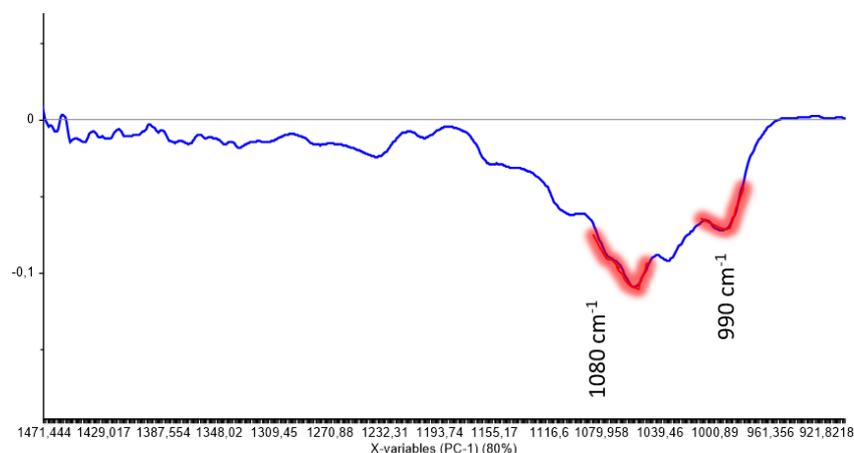


Figure 153: Contributions des variables suivant PC1 pour les échantillons traités par électroporation LP au sein de la face pétri

Nous remarquons encore une fois une large contribution négative dans la région spectrale [1160-960 cm⁻¹] et notamment pour les bandes 1080 et 990 cm⁻¹. Ces analyses sont en adéquation avec l'évolution observée au niveau des indicateurs univariés de la « zone mixte » et de la réponse cellulaire, 24h après traitement LP au sein de la face « pétri ».

La représentation graphique de l'ensemble des spectres IRTF des feuillets face milieu avant et après traitement LP dans la nouvelle base des 2 premières composantes principales est reportée sur la Figure 154.

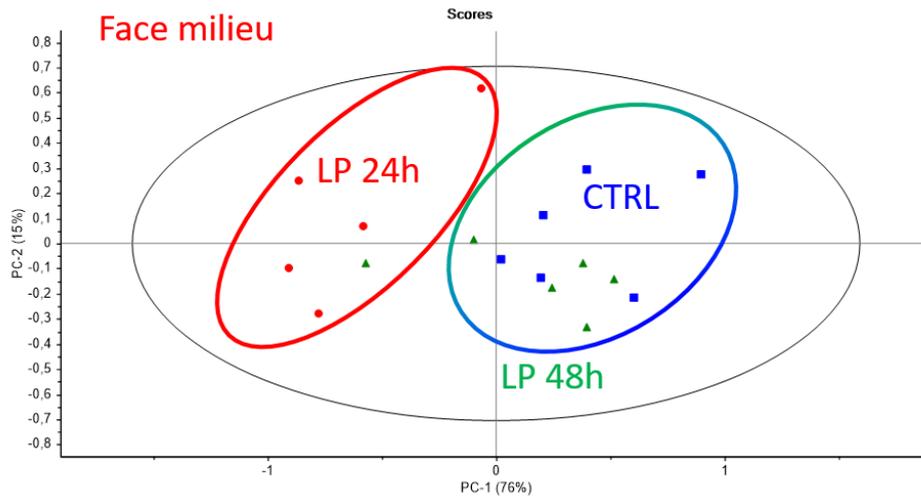


Figure 154: Projection des profils IRTF des feuillets dermiques face milieu sur PC1 et PC2 regroupement suivant le traitement LP ; feuillets contrôle (carrés bleus), LP24h (ronds rouges) et LP48h (triangles verts)

Sur la Figure 155, les contributions des variables de la région spectrale [1270-960 cm^{-1}] sont mises en évidence, suivant l'axe PC1.

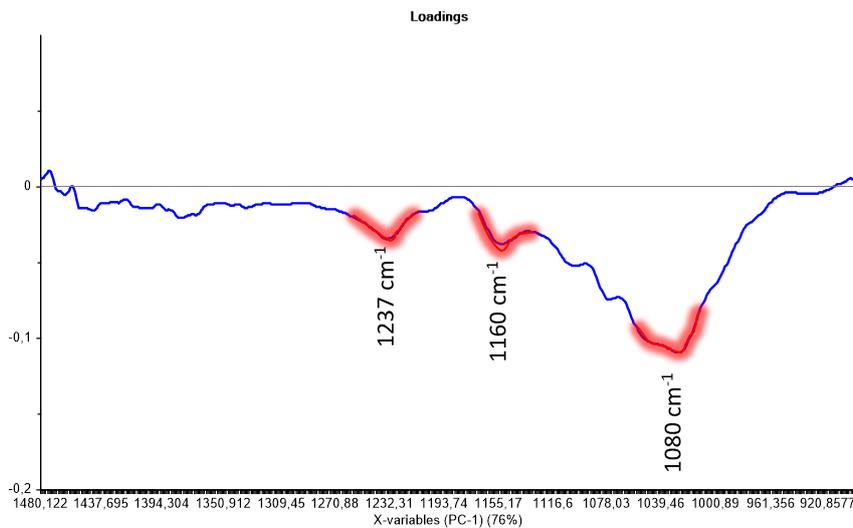


Figure 155: Contributions des variables suivant PC1 pour les échantillons traités par électroporation LP au sein de la face milieu

Tout comme pour les échantillons SP face milieu, les contributions négatives des bandes 1237, 1160 et 1080 cm^{-1} mettent en lumière les zones affectées 24h après traitement LP au sein de la face milieu. L'indicateur de la « zone mixte », principalement associé à la bande 1080 cm^{-1} , met aussi en évidence un état transitoire, 24 et 48h après le traitement LP.

V.B.1.4 Analyses thermiques des feuillets dermiques avant et après traitement par électroporation

Il a également été intéressant de suivre l'évolution de la réponse thermique de la phase suite à l'exposition aux champs électriques de type électroporation.

Les thermogrammes ACD de l'ensemble des feuillets dermiques ont été enregistrés dans les mêmes conditions que les feuillets dermiques en condition contrôle. Nous avons représenté sur la Figure 156 l'ensemble de ces thermogrammes dans la zone de dénaturation de la phase collagénique.

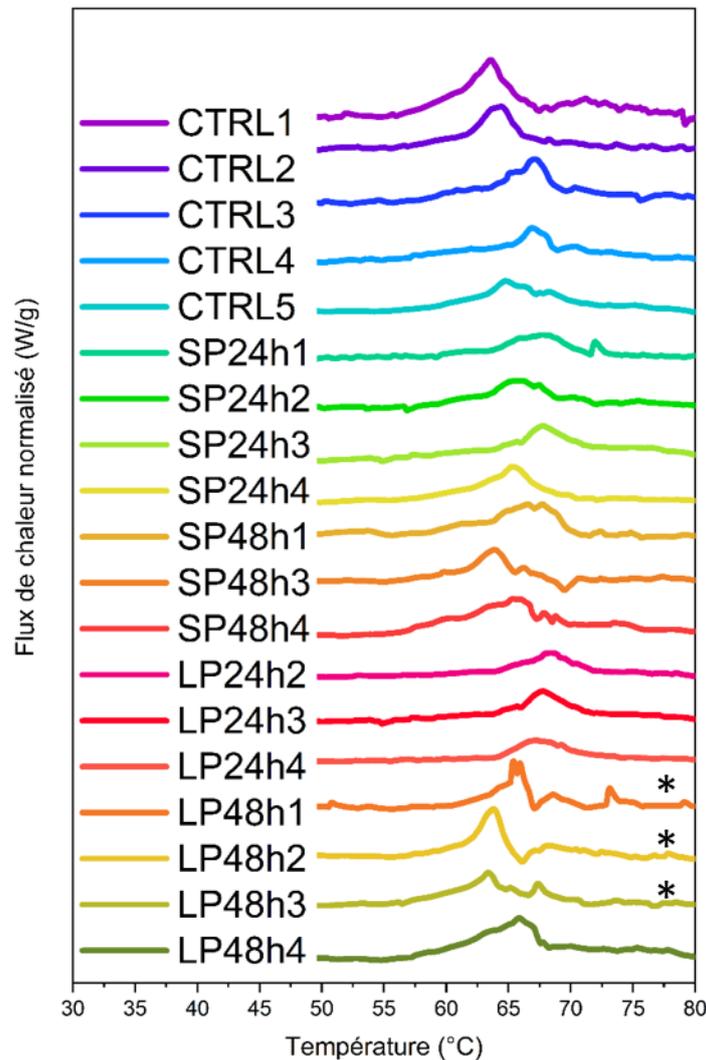


Figure 156: Thermogrammes ACD entre 30 et 80°C des échantillons CTRL (n=5), SP24h (n=4), SP48h (n=3), LP24h (n=3) et LP48h (n=4)

Pour chaque thermogramme, nous observons le phénomène endothermique caractéristique de la dénaturation du collagène entre 55 et 80°C. Il est à noter une modification de la forme de l'endotherme 48h après électroporation LP (voir * sur la Figure 156), probablement caractéristique d'une modification structurale du collagène.

Afin d'évaluer précisément la stabilité thermique et l'intégrité des feuillets dermiques suivant les protocoles électriques, l'enthalpie de dénaturation ΔH_d ainsi que les températures de dénaturation ont été relevées sur chaque thermogramme et les données statistiques associées sont présentées sur les Figure 157 et Figure 158.

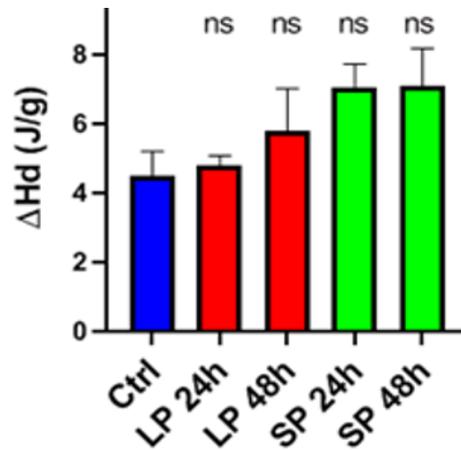


Figure 157: Enthalpies de dénaturation du collagène des feuillets dermiques avant/après traitement physique

Malgré une tendance à l'augmentation de l'enthalpie de dénaturation après l'électroporation, aucune différence statistique n'a été observée sur la Figure 157. Cet indicateur caractéristique de la rupture des liaisons intra moléculaires du collagène lors de la dénaturation n'est très certainement pas assez sensible pour mettre en évidence une différence significative entre les cinq catégories d'échantillons.

La Figure 158 présente les températures de dénaturation du collagène (T_{ONSET} , T_{MAX} , T_{MID} et T_{END}), qui sont généralement sensibles à la dégradation, à la fragmentation ou à l'expansion du réseau de collagène [237] ou inversement à la rigidification de celui-ci [140].

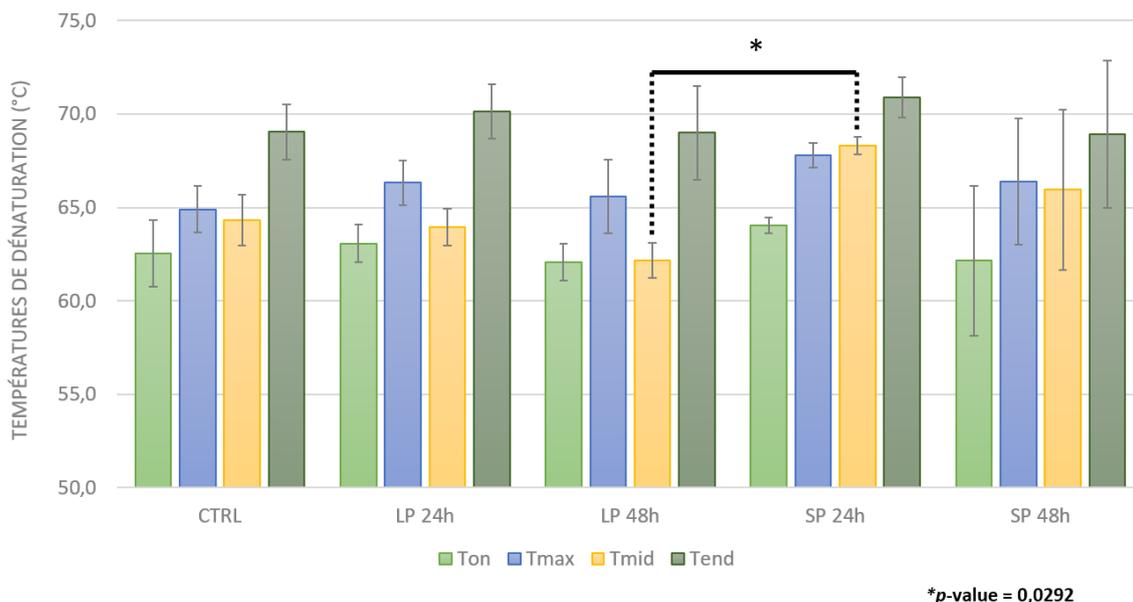


Figure 158: Analyse uni-variée des températures de dénaturation du collagène des feuillets dermique avant/après traitement physique

L'analyse uni-variées ne met pas en évidence de différence significative entre les températures de dénaturation des feuillets contrôle et des feuillets traités par électroporation. Seule une différence significative est notée entre la T_{MID} (LP 48h) et la T_{MID} (SP 24h).

V.B.2. Effet de l'inhibiteur des métalloprotéases (MMP) sur la matrice de collagène

Les analyses IRTF et le dosage de l'hydroxyproline précédemment présentés ont montré une diminution transitoire de la teneur en collagène suite au traitement électrique, tandis que les analyses par transcriptomique ont révélé une sous-expression des ARNm aux gènes de la famille des collagènes. La quantification par fluorimétrie a souligné une augmentation de l'activité des MMP (mais pas de leur expression) dans les feuillets dermiques après électroporation [234]. Les MMP sont les enzymes responsables de la dégradation des collagènes.

Afin de mieux comprendre le processus de modulation du collagène dans les feuillets dermiques électroporés, une étude conjointe par IRTF et par dosage fluorimétrique a ainsi été menée pour vérifier si l'ajout d'un inhibiteur pharmacologique de MMP (le GM6001, aussi nommé ilomastat) dans le milieu de culture entraîne ou pas la restauration du contenu collagénique des feuillets dermiques.

Comme décrit en début de chapitre, le rapport d'aire $A(1338\text{ cm}^{-1})/A(1452\text{ cm}^{-1})$ associé à l'indicateur « collagène », a été calculé pour la face du feuillet étudiée après traitement, avec et sans inhibiteur de MMP. Les résultats sont présentés en Figure 159.

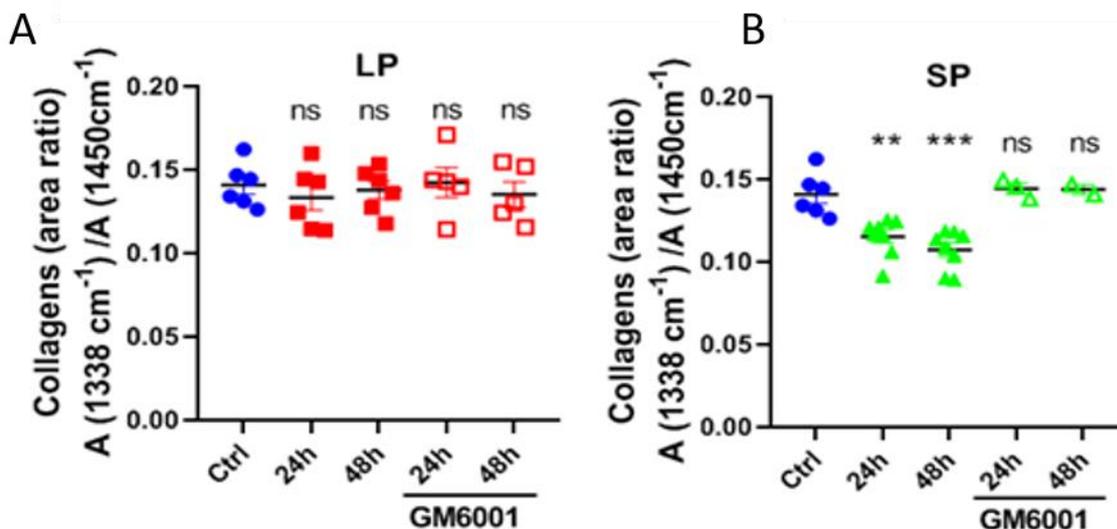


Figure 159: Boîtes de dispersion du ratio $A(1338\text{ cm}^{-1})/A(1452\text{ cm}^{-1})$ pour les feuillets dermiques face pétri avant et après traitement, avec ou sans inhibiteur de MMP (GM6001 100 μM)

Les résultats montrent que la baisse significative de l'indicateur associé au collagène observée 24 et 48H après le traitement SP est annihilée lorsque l'inhibiteur des MMP est présent dans le milieu de culture.

Dans le cas du traitement LP, il n'y avait pas de baisse significative de l'indicateur IRTF associé au collagène avec le traitement, et la présence de l'inhibiteur des MMP n'entraîne pas de variation significative de cet indicateur.

La quantification par fluorimétrie effectuée par l'équipe IDeAs a démontré une augmentation de l'activité des MMP dans les tissus après traitement physique [234]. Lorsque l'inhibiteur pharmacologique est présent dans le milieu de culture, l'activité des MMP quantifiée par fluorométrie (Figure 160), n'est plus exacerbée dans les feuillets soumis à l'électroporation.

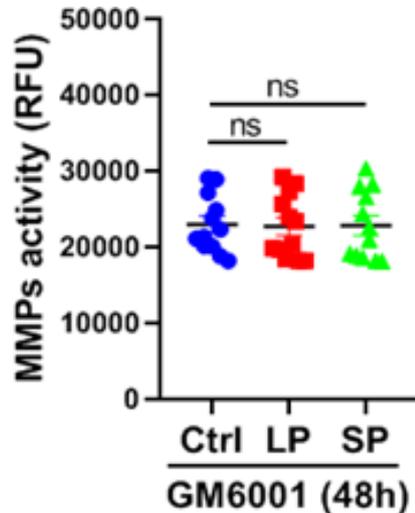


Figure 160: Quantification par fluorimétrie de l'activité des MMP des substituts cutanés avec inhibiteur de MMP [234]

La Figure 161 présente le dosage de l'hydroxyproline dans les feuillets une semaine après l'électroporation avec et sans inhibiteur de MMP

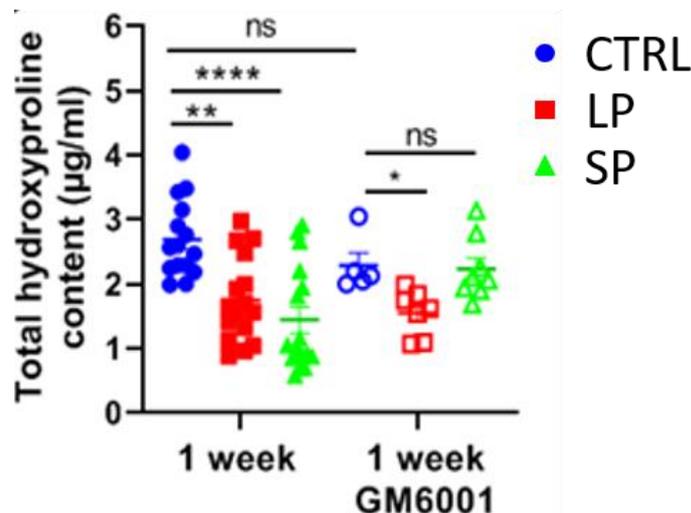


Figure 161: Quantification de l'hydroxyproline des feuillets avant/après traitement avec et sans inhibiteur de MMP [234]

Les résultats montrent une restauration du contenu collagénique une semaine après l'ajout de l'inhibiteur GM6001 et notamment après traitement SP. Les données vibrationnelles confirment cette tendance.

V.C Résumé

Les résultats d'analyse vibrationnelle et thermique mettent en évidence la validation du modèle de feuillets dermiques à l'élaboration de substituts cutanés.

La réponse spectrale du feuillet dermique se rapproche à 90% de celle du derme humain et de la *lamina propria* porcine. La fine indexation des bandes d'absorption permet de confirmer la présence de nombreux composés constitutifs des tissus dermiques, tels que le collagène, les hydrates de carbone, les acides nucléiques ainsi que les lipides. Une polarisation des feuillets dermiques est mise en évidence avec une quantité de collagène plus importante sur la face pétri que sur la face milieu.

Les analyses ACD sur les substituts cutanés contrôles ont permis de vérifier la présence de l'endotherme caractéristique de la rupture de la structure en triple hélice de collagène. Il est à noter cependant une production et une maturation du collagène plus faible au sein des échantillons modèles par rapport au derme. La faible quantité d'eau liée au sein des substituts cutanés contrôles confirme une faible maturation du réseau protéique comparé à celui observé dans le derme.

Les analyses IRTF des feuillets dermiques avec traitement par électroporation et/ou avec inhibiteurs de MMP ont mis en lumière la modulation des constituants de la MEC. En effet, 24h après traitement par électroporation, il est observé une diminution notable de la teneur en collagène ainsi qu'une augmentation de la composante cellulaire quelle que soit la face étudiée. Ces variations sont suivies d'un retour à l'équilibre 48h après traitement par électroporation.

Il s'avère qu'une déficience dans la régulation de la matrice extracellulaire et de son remodelage peut être à l'origine de cancers ou de fibroses. Les protéines régulant le remodelage des MEC dermiques sont donc stratégiquement des éléments cibles à visée thérapeutique. L'utilisation d'inhibiteur pharmacologique de MMP s'est révélée efficace à la restauration du contenu collagénique après traitement physique.

Les études complémentaires réalisées par l'équipe IDeAS et Phypol montrent ainsi que les effets des champs électriques de type électroporation induisent une dégradation locale et transitoire de la matrice extracellulaire cutanée, en particulier des collagènes. La Figure 162 résume les mécanismes d'action cellulaires complémentaires : une diminution de la production des collagènes, une diminution de leur maturation et une augmentation de leur dégradation.

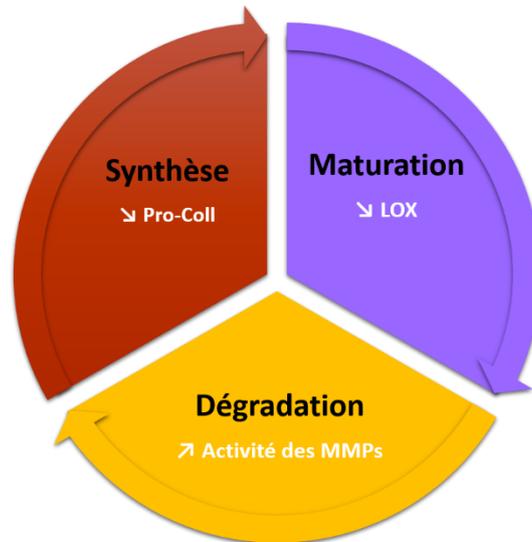


Figure 162: Facteurs liés à la diminution de la teneur globale en collagène après application des champs électriques externes de type électroporation sur un modèle de feuillets dermiques humains

La modulation des protéines constitutives de la matrice extracellulaire semble agir à 3 niveaux comme explicité sur :

- La synthèse : les résultats de transcriptomique et du test ELISA (Figure 147) montrent la diminution de l'expression et de la production de pro-peptide du collagène Ia1 24 et 48h après traitement SP et LP et donc une diminution de la production de collagène par rapport aux échantillons condition contrôle, quantifiée par le dosage chimique de l'hydroxyproline.
- La maturation : la modulation des ARNm des familles de gènes codant les enzymes de maturation (réticulation) des collagènes telles que les lysyl-oxidases (LOX) et les transglutaminases (TG) a été réalisée dans le cadre de cette collaboration. Ces résultats (Annexe 70) montrent une diminution du nombre de transcrits de ces gènes après application des champs électriques de type électroporation. Il semblerait donc que ces traitements physiques induisent une diminution de la maturation de collagène dans les tissus cutanés.
- La dégradation : les tests biochimiques (Annexe 71) ont démontré que la dégradation des collagènes observées est principalement induite par une augmentation de l'activité des MMP, induites dès 6 heures après l'électrostimulation et maintenue pendant au moins 48 heures. Les dosages protéiques par ELISA indiquent que les principales MMP cutanées ne sont pas sur-exprimées après le traitement, il s'agit donc bien d'une sur-activation de ces enzymes. Des expériences complémentaires menées par l'équipe IDeAS a démontré que cette sur-activité des MMP est dépendant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées au niveau intracellulaire après application des champs électriques.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse a permis de valider l'**utilisation combinée** des **techniques vibrationnelles, calorimétriques et mécaniques** pour caractériser des tissus **épithélio-conjonctifs** porcins, murins et humains et en extraire des **marqueurs reproductibles et fiables** à l'état hydraté et/ou déshydraté.

Au niveau moléculaire, la spectroscopie IRTF en mode ATR et le traitement ad hoc des spectres a permis de révéler l'**empreinte digitale vibrationnelle** des tissus épithélio-conjonctifs et de définir des indicateurs associés aux ratios des différents composés des deux couches constitutives de ces tissus.

Au niveau hydrique et structural, la quantification des différents types d'eau et l'évaluation de la **stabilité thermique de la phase collagénique** de ces tissus biologiques ont pu être déterminées par analyse calorimétrique diatherme.

Enfin, **au niveau fonctionnel**, nous avons pu montrer la capacité de l'analyse mécanique pour caractériser le **comportement viscoélastique** de ces tissus épithélio-conjonctifs de faible dimension dans des conditions s'approchant de l'état physiologique (état hydraté, conditions occlusales, température physiologique).

Il serait pertinent de compléter cette étude en développant un protocole de caractérisation diélectrique de la muqueuse buccale, pour obtenir des biomarqueurs de la dynamique moléculaire des différents composés. Une étude préliminaire a été entreprise en ce sens sur la muqueuse porcine et donne des résultats encourageants.

Dans le cadre de l'étude clinique, nous avons pu révéler différents indicateurs du **vieillessement physiopathologique** de la muqueuse buccale humaine. En dépit de la disparité des prélèvements, nous avons pu mettre en évidence des **liens** entre ces marqueurs biophysiques et les données cliniques.

En réponse à l'objectif principal, nous avons montré une **diminution de l'eau liée**, associée à une **perte de stabilité thermique** de la phase collagénique pour la muqueuse orale des patients âgés. Cette **altération de l'organisation hydrique est à mettre en regard des modifications du biofluide associé, avec une diminution de la fraction protéique salivaire** et notamment des mucines. La déshydratation combinée à la déstabilisation des **fibres de collagène, protéine structurale majeure de ce tissu épithélio-conjonctif, impacte sans aucun doute la fonctionnalité de la muqueuse buccale des patients âgés.**

En réponse aux différents objectifs secondaires, nous avons mis en lumière :

- L'influence de l'« inflammaging », avec en particulier :
 - Une **diminution de la composante collagénique et de la rigidité** chez les patients atteints d'inflammation locale : **la gingivite.**
 - Une modification de la **composante moléculaire** (lipides, protéines, sucres et acides nucléiques) de l'*épithélium* et de la *lamina propria* chez les patients atteints d'inflammation générale : **le diabète.**

- Des corrélations entre la muqueuse et la salive : par exemple, la **diminution de l'hydratation** de la muqueuse est associée à des **modifications moléculaires** majeures de la **salive** chez les patients sous traitement sialoprive.
- Les liens entre la **physiologie**, la **pathologie** et la **thérapeutique** : les pathologies cardiovasculaires et les traitements associés ont également de nombreuses répercussions sur l'**organisation hydrique**, la **stabilité thermique** et la composition moléculaire des muqueuses et la composition salivaire.

La population de patients âgés étudiée dans cette thèse est polypathologique et polymédiquée. Il serait intéressant d'isoler les effets du vieillissement intrinsèque (en étudiant une population de sujets âgés et jeunes exempts de pathologies) mais aussi de révéler l'évolution spécifique des marqueurs biophysiques en fonction d'une seule pathologie (patients atteints de pathologies cardiovasculaires jeunes et âgés).

Les marqueurs vibrationnels salivaires apparaissent comme une voie prometteuse pour le développement de tests diagnostiques, rapides et faciles à mettre en œuvre pour le clinicien et donnant une réponse instantanée.

Les perturbations hydriques et moléculaires de la muqueuse avec l'âge laissent supposer une perte de fonctionnalité qui devra être complétée par la comparaison de la réponse viscoélastique des muqueuses de patients jeunes et âgés. Cette piste permettra le développement de nouvelles bases prothétiques biomécaniquement compatibles.

Le vieillissement extrinsèque, induit par le port de prothèse, n'a pas été abordé dans le cadre de cette étude. Là aussi, il sera pertinent d'étudier et de comparer le comportement viscoélastique de muqueuses de patients avec ou sans dispositif prothétique.

Enfin, il a été possible de transposer le protocole de caractérisation biophysique de tissus épithélio-conjonctifs à l'analyse de feuillets dermiques, issus de l'ingénierie tissulaire. Nous avons pu comparer la matrice extracellulaire endogène des feuillets dermiques à celle du derme humain et ainsi valider la mise en place du protocole d'élaboration des tissus par l'approche d'auto-assemblage. Cette étude pourra être complétée par la validation d'un substitut épithélio-conjonctif complet synthétisé in vitro. Cette approche offre de belles perspectives au remplacement ou à la restauration de tissus humains cutanés ou gingivaux.

En complément des analyses protéomiques et biochimiques, l'analyse biophysique des feuillets traités par électroporation a montré que cette technique permettait de moduler les protéines constitutives de la matrice extracellulaire au niveau de leur synthèse, leur maturation et leur dégradation. Les résultats mis en évidence lors de l'étude MMOBUCC pourront être mis à profit pour orienter les cibles thérapeutiques attendues par électroporation (traitements dermatologiques).

Références bibliographiques

- [1] R. Tang, "Modifications moléculaires et organisationnelles du derme au cours des vieillissements intrinsèque et photo-induit", Thèse de l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2017.
- [2] V. Samouillan *et al.*, "Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprostheses", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 46, pp. 531–538, 1999.
- [3] A. T. Cruchley et L. A. Bergmeier, "Structure and Functions of the Oral Mucosa" in *Oral Mucosa in Health and Disease*, L. A. Bergmeier, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 1–18.
- [4] L. A. Bergmeier, "*Oral Mucosa in Health and Disease*", L. A. Bergmeier, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 1–184.
- [5] C. Squier and K. I. M. A. Brogden, "Human Oral Mucosa" in *Human Oral Mucosa*, 1st ed., C. Squier and K. A. Brogden, Eds. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2011, pp. 19–52.
- [6] J. Montiel, "Gestion de l'esthétique muco-gingivale de l'incisive centrale en implantologie", Thèse de l'Université Aix-Marseille, 2017.
- [7] S. Prestin, S. I. Rothschild, C. S. Betz, and M. Kraft, "Measurement of epithelial thickness within the oral cavity using optical coherence tomography," *Head Neck*, vol. 34, pp. 1777–1781, 2012.
- [8] T. Shinkawa *et al.*, "Poor Chewing Ability Is Associated with Lower Mucosal Moisture in Elderly Individuals," *Tohoku J. Exp. Med.*, vol. 219, pp. 263–267, 2009.
- [9] D. V. Dawson, D. R. Drake, J. R. Hill, K. A. Brogden, C. L. Fischer, and P. W. Wertz, "Organization, barrier function and antimicrobial lipids of the oral mucosa," *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 35, pp. 220–223, 2013.
- [10] S. Groeger and J. Meyle, "Oral Mucosal Epithelial Cells," *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 208, 2019.
- [11] P. C. Hsieh, Y. T. Jin, C. W. Chang, C. C. Huang, S. C. Liao, and K. Yuan, "Elastin in oral connective tissue modulates the keratinization of overlying epithelium," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 37, pp. 705–711, 2010.
- [12] H. E. Schroeder and M. A. Listgarten, "The gingival tissues: the architecture of periodontal protection," *Periodontol. 2000*, vol. 13, pp. 91–120, 2007.
- [13] C. de Jaeger and P. Cherin, "Matrice extracellulaire, physiologie et vieillissement vasculaire," *Médecine & Longévité*, vol. 4, pp. 41–53, 2012.
- [14] V. Kamath, K. Rajkumar, and A. Kumar, "Expression of type I and type III collagens in oral submucous fibrosis: An immunohistochemical study," *J. Dent. Res. Rev.*, vol. 2, p. 161, 2015.
- [15] C. Chavrier, M. L. Couble, H. Magloire and, and J. A. Grimaud, "Connective tissue organization of healthy human gingiva.," *J. Periodontal Res.*, vol. 19, pp. 221–229, 1984.

- [16] G. E. Romanes, C. Schroter-Kermani, N. Hinz, H. C. Wachtel, and J.-P. Bernimoulin, “Immunohistochemical localization of collagenous components in healthy periodontal tissues of the rat and marmoset (*Callithrix jacchus*)..,” *J. Periodontal Res.*, vol. 27, pp. 101–110, 1992.
- [17] P. M. Bartold, “Connective tissues of the periodontium. Research and clinical implications,” *Aust. Dent. J.*, vol. 36, pp. 255–268, 1991.
- [18] C. Chavrier, M. L. Couble, H. Magloire and J. A. Grimaud, “Connective tissue organization of healthy human gingiva: Ultrastructural localization of collagen types I–III–IV,” *J. Periodontal Res.*, vol. 19, pp. 221–229, 1984.
- [19] S. Ricard-Blum, “The Collagen Family,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, pp. a004978–a004978, 2011.
- [20] J. S. Graham, A. N. Vomund, C. L. Phillips, and M. Grandbois, “Structural changes in human type I collagen fibrils investigated by force spectroscopy,” *Exp. Cell Res.*, vol. 299, pp. 335–342, 2004.
- [21] S. Kumari, T. K. Panda, and T. Pradhan, “Lysyl Oxidase: Its Diversity in Health and Diseases,” *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 32, pp. 134–141, 2017.
- [22] D. Bridges *et al.*, “Folding Mechanism of the Triple Helix in Type-I11 Collagen and Type-I11 pN-Collagen,” vol. 632, pp. 619–632, 1980.
- [23] C. Chavrier, “The elastic system fibres in healthy human gingiva,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 35, pp. S223–S225, 1990.
- [24] I. Pasquali-Ronchetti and M. Baccaeani-Contri, “Elastic fiber during development and aging,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 38, pp. 428–435, 1997.
- [25] C. Baldock *et al.*, “Shape of tropoelastin, the highly extensible protein that controls human tissue elasticity,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, pp. 4322–4327, 2011.
- [26] N. Sakamoto, H. Okamoto, and K. Okuda, “Qualitative and quantitative analyses of bovine gingival glycosaminoglycans,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 23, pp. 983–987, 1978.
- [27] K. Takagaki, H. Munakata, I. Kakizaki, M. Iwafune, T. Itabashi, and M. Endo, “Domain structure of chondroitin sulfate E octasaccharides binding to type V collagen,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, pp. 8882–8889, 2002.
- [28] T. M. Handel, Z. Johnson, S. E. Crown, E. K. Lau, M. Sweeney, and A. E. Proudfoot, “Regulation of protein function by glycosaminoglycans - As exemplified by chemokines,” *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 74, pp. 385–410, 2005.
- [29] G. M. Turino and J. O. Cantor, “Hyaluronan in respiratory injury and repair,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 167, pp. 1169–1175, 2003.
- [30] B. Gerdin, “Dynamic role of Hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation,” *Journal of Internal Medicine*, vol. 242, pp. 49–55, 1997.
- [31] C. Chothia and E. Y. Jones, “The molecular structure of cell adhesion molecules,” *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 66, pp. 823–862, 1997.
- [32] A. S. Narayanan, R. C. Page, and D. F. Meyers, “Characterization of Collagens of Diseased Human Gingiva”, *Biochemistry*, vol. 19, pp. 5037–5043, 1980.

- [33] G. Carcelain *et al.*, "*Immunologie fondamentale et immunopathologie*", Enseignements thématique et intégré Tissu lymphoïde et sanguin Immunopathologie et immuno-intervention, Ed. Elsevier Masson, pp. 1-322, 2018.
- [34] H. Ahsan, "Biomolecules and biomarkers in oral cavity: bioassays and immunopathology", *J. Immunoass. Immunochem.*, vol. 40, pp. 52–69, 2019.
- [35] B. Pellat, "Salives et milieu buccal", *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris)*, pp. 1-10, 2011.
- [36] J. A. Bosch, "The use of saliva markers in psychobiology: Mechanisms and methods" *Monogr. Oral Sci.*, vol. 24, pp. 99–108, 2014.
- [37] L. Devoize and R. Dallel, "Salivation", *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Médecine buccale, 28-150M-10*, 2010.
- [38] M. P. Vidailhet B, Robin O, Polo A, Bravetti P, "Salivation" *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Médecine buccale*, pp. 3(1) : 1-8, 2008.
- [39] S. Bakhtiari, P. Toosi, S. Samadi, and M. Bakhshi, "Assessment of Uric Acid Level in the Saliva of Patients with Oral Lichen Planus," *Med. Princ. Pract.*, vol. 26, no. 1, pp. 57–60, 2017.
- [40] S. Bhat, S. Babu, S. Bhat, R. Castelino, K. Rao, and M. Madi, "Status of serum and salivary ascorbic acid in oral potentially malignant disorders and oral cancer," *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.*, vol. 38, pp. 306–310, 2017.
- [41] Y. Trigui, "Biomarqueurs de la salive et santé générale," Thèse de l'Université de Lorraine, 2018.
- [42] S. Gasperment, "La Salive Et Ses Biomarqueurs : Implications Physiopathologiques Et Médicales", Thèse de l'Université Claude Bernard (Lyon I), 2018.
- [43] J. W. Rowe and R. L. Kahn, "Successful Aging," *Gerontologist*, vol. 37, pp. 433–440, 1997.
- [44] B. A. Gilchrest and M. Yaar, "Ageing and photoageing of the skin: Observations at the cellular and molecular level," *Br. J. Dermatol.*, vol. 127, pp. 25–30, 1992.
- [45] E. M. Buckingham and A. J. Klingelutz, "The role of telomeres in the ageing of human skin," pp. 297–302, 2011.
- [46] A. Höhn *et al.*, "Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence," *Redox Biol.*, vol. 11, pp. 482–501, 2017.
- [47] K. Schwartz, "Séminaires Inflammation et maladies : clés de compréhension", *Inserm*, 2012.
- [48] N. C. Avery and A. J. Bailey, "The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen," *Pathol. Biol.*, vol. 54, pp. 387–395, 2006.
- [49] M. Sasaki, "*Histomorphometric analysis of Age-Related changes in Epithelial Analysis Thickness and Langerhans Cell Density of the Human Tongue*", *Tohoku J. Exp. Med.*, pp. 321–336, 1994.
- [50] Z. Hamzah, D. Indartin, and Z. Meilawaty, "The progressive low chronic inflammation on oral tissue in elderly," *Proceeding 1st Int. Conf. Med. Heal. Sci.*, pp. 177–181, 2016.

- [51] K. Akimoto, "Observations on the Structural Changes According to Aging of Oral Mucous Membrane in the Elderly-Structure of Buccal Mucous Membrane in the Vicinity of Angulus Oris-," *J. Stomatol. Soc.*, vol. 71, pp. 80–94, 2004.
- [52] P. Rajalalitha and S. Vali, "Molecular pathogenesis of oral submucous fibrosis - A collagen metabolic disorder," *J. Oral Pathol. Med.*, vol. 34, pp. 321–328, 2005.
- [53] D. Harman, "Aging: A Theory on Free Radical Radiation Chemistry," *J. Gerontol.*, vol. 11, pp. 298–300, 1956.
- [54] D. Harman, "Free radical theory of aging," *Mutat. Res. DNAging*, vol. 275, pp. 257–266, 1992.
- [55] J. Mazat and S. Ransac, "Le complexe bc 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne selon l'hypothèse du cycle Q de Mitchell," *médecine/sciences*, vol. 26, pp. 1079–1086, 2010.
- [56] S. Kar, S. Subbaram, P. M. Carrico, and J. A. Melendez, "Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease," *Respir. Physiol. Neurobiol.*, vol. 174, pp. 299–306, 2010.
- [57] P. Lutzler, M. Khoualene, K. Bekov, N. Lapalus, V. Carlier, and P. Hutzler, "Les mécanismes du vieillissement," *Phytotherapie*, vol. 3, pp. 53–56, 2005.
- [58] N. Sardaro *et al.*, "Oxidative Stress and Oral Mucosal Diseases : An Overview," *In vivo*, vol. 296, pp. 289–296, 2019.
- [59] R. J. Lamont and H. F. Jenkinson, "Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, pp. 1244–1263, 1998.
- [60] M. Fredriksson, A. Gustafsson, B. Asman, and K. Bergstrom, "Hyper-reactive peripheral neutrophils in adult periodontitis: generation of chemiluminescence and intracellular hydrogen peroxide after in vitro priming and FcγR-stimulation," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 25, pp. 394–398, 1998.
- [61] E. Boulanger, P. Dequiedt, and J.-L. Wautier, "Les produits de glycation avancée (AGE): de nouvelles toxines?," *Néphrologie*, vol. 23, pp. 349–357, 2002.
- [62] K. L. Reigle *et al.*, "Non-enzymatic glycation of type I collagen diminishes collagen-proteoglycan binding and weakens cell adhesion," *J. Cell. Biochem.*, vol. 104, pp. 1684–1698, Aug. 2008.
- [63] N. C. Avery and A. J. Bailey, "Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: Relevance to aging and exercise," *Scand. J. Med. Sci. Sport.*, vol. 15, pp. 231–240, 2005.
- [64] C. Franceschi and J. Campisi, "Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases," *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 69, pp. S4–S9, 2014.
- [65] C. Franceschi and J. Campisi, "Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases," vol. 69, pp. 4–9, 2014.
- [66] L. Zuo *et al.*, "Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases : From Molecular Mechanisms to Novel Treatments", *Int J Mol Sci*, 2019.

- [67] E. M. Cardoso, C. Reis, and M. C. Manzanares-Céspedes, “Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases,” *Postgrad. Med.*, vol. 130, pp. 98–104, 2018.
- [68] L. Hayflick, “Human cells and aging,” *Sci. Am.*, vol. 218, pp. 32–37, 1968.
- [69] J. M. van Deursen, “The role of senescent cells in ageing,” *Nature*, vol. 509, pp. 439–446, 2014.
- [70] P. Thomas, S. Harvey, T. Gruner, and M. Fenech, “The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down’s syndrome and normal ageing compared to young healthy controls,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 638, pp. 37–47, 2008.
- [71] M. K. Kang, R. H. Kim, K.-H. Shin, W. Zhong, K. F. Faull, and N.-H. Park, “Senescence-associated decline in the intranuclear accumulation of hOGG1- α and impaired 8-oxo-dG repair activity in senescing normal human oral keratinocytes in vivo,” *Exp. Cell Res.*, vol. 310, pp. 186–195, 2005.
- [72] E. J. Ryan, P. D. Toto, and A. W. Gargiulo, “Aging in Human Attached Gingival Epithelium,” *J. Dent. Res.*, vol. 53, pp. 74–76, 1974.
- [73] J. Uitto, “Understanding Premature Skin Aging,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 337, pp. 1463–1465, 1997.
- [74] S. Séguier, A. Bodineau, A. Giacobbi, J. Tavernier, and M. Folliguet, “Pathologies bucco-dentaires du sujet âgé: répercussions sur la nutrition et la qualité de vie”, Commission de santé publique, pp. 1–11, 2009.
- [75] H. Al-Imam, E. B. Özhayat, A. R. Benetti, A. M. L. Pedersen, and K. Gotfredsen, “Oral health-related quality of life and complications after treatment with partial removable dental prosthesis,” *J. Oral Rehabil.*, vol. 43, pp. 23–30, 2016.
- [76] R. Guiglia *et al.*, “Aging and Oral Health: Effects in Hard and Soft Tissues,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 16, pp. 619–630, 2010.
- [77] J. Chen, R. Ahmad, W. Li, M. Swain, and Q. Li, “Biomechanics of oral mucosa,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 12, p. 20150325, 2015.
- [78] S. Mori, T. Sato, T. Hara, K. Nakashima, and S. Minagi, “Effect of continuous pressure on histopathological changes in denture-supporting tissues,” *J. Oral Rehabil.*, vol. 24, pp. 37–46, 1997.
- [79] M. H. Lacoste-Ferré, S. Hermabessière, F. Jézéquel, and Y. Rolland, “L’*é*cosystème buccal chez le patient âgé,” *Geriatr. Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.*, vol. 11, pp. 144–150, 2013.
- [80] E. M. Chávez and J. A. Ship, “Sensory and Motor Deficits in the Elderly: Impact on Oral Health,” *J. Public Health Dent.*, vol. 60, pp. 297–303, 2000.
- [81] M.-H. Lacoste-Ferré, S. Hermabessière, F. Jézéquel, and Y. Rolland, “Oral ecosystem in elderly people,” *Gériatrie Psychol. Neuropsychiatr. du Vieillessement*, vol. 11, pp. 144–150, 2013.
- [82] A. J. Atkinson *et al.*, “Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 69, pp. 89–95, 2001.

- [83] C. Krafft, D. Codrich, G. Pelizzo, and V. Sergio, “Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study,” *J. Biophotonics*, vol. 1, pp. 154–169, 2008.
- [84] E. Ly-Morin, O. Piot, and M. Manfait, “La micro-imagerie infrarouge appliquée au diagnostic des cancers cutanés,” *Photoniques*, pp. 26–29, 2015.
- [85] K. Papamarkakis *et al.*, “Cytopathology by optical methods: Spectral cytopathology of the oral mucosa,” *Lab. Investig.*, vol. 90, pp. 589–598, 2010.
- [86] A. L. Stelling *et al.*, “Infrared Spectroscopic Studies of Cells and Tissues: Triple Helix Proteins as a Potential Biomarker for Tumors,” *PLoS One*, vol. 8, pp. 1–11, 2013.
- [87] I. C. C. Ferreira *et al.*, “Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis,” *J. Oncol.*, vol. 2020, 2020.
- [88] E. Staniszewska, K. Malek, and M. Baranska, “Rapid approach to analyze biochemical variation in rat organs by ATR FTIR spectroscopy,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 118, pp. 981–986, 2014.
- [89] H. Ukkonen *et al.*, “Biochemical Changes in Irradiated Oral Mucosa: A FTIR Spectroscopic Study,” *Biosensors*, vol. 9, p. 12, Jan. 2019.
- [90] A. Barth, “Infrared spectroscopy of proteins,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1767, pp. 1073–1101, 2007.
- [91] S. Yoshida *et al.*, “Analysis of human oral mucosa ex vivo for fatty acid compositions using fourier-transform infrared spectroscopy,” *Lipids*, vol. 43, pp. 361–372, 2008.
- [92] A. Barth, “The infrared absorption of amino acid side chains,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 74, pp. 141–173, 2000.
- [93] Y. Fukuyama, S. Yoshida, S. Yanagisawa, and M. Shimizu, “A Study on the Differences Between Oral Squamous Cell Carcinomas and Normal Oral Mucosae Measured by,” *Biospectroscopy*, vol. 5, pp. 117–126, 1999.
- [94] A. Sahu, A. Deshmukh, A. D. Ghanate, S. P. Singh, P. Chaturvedi, and C. M. Krishna, “Raman Spectroscopy of Oral Buccal Mucosa: A Study on Age-Related Physiological Changes and Tobacco-Related Pathological Changes,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 11, pp. 529–541, 2012.
- [95] J. C. Schwarz, E. Pagitsch, and C. Valenta, “Comparison of ATR-FTIR spectra of porcine vaginal and buccal mucosa with ear skin and penetration analysis of drug and vehicle components into pig ear,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 50, pp. 595–600, 2013.
- [96] A. Hynes, D. A. Scott, A. Man, D. L. Singer, M. G. Sowa, and K.-Z. Liu, “Molecular mapping of periodontal tissues using infrared microspectroscopy,” *BMC Med. Imaging*, vol. 5, p. 2, Dec. 2005.
- [97] R. Sethupathi, M. Gohulkumar, and N. Krishnakumar, “FT-IR spectroscopic detection of biochemical and structural changes associated with early tumor transformation in hamster oral carcinogenesis,” *Asian J. Chem.*, vol. 31, pp. 1349–1356, 2019.
- [98] S. Banerjee *et al.*, “Fourier-transform-infrared-spectroscopy based spectral-biomarker selection towards optimum diagnostic differentiation of oral leukoplakia and cancer,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, pp. 7935–7943, 2015.

- [99] P. V. Seredin, D. L. Goloshchapov, Y. A. Plotnikova, Y. A. Ippolitov, and J. Vongsvivut, “Diagnostic potential of the oral fluid for the observation people with multiple dental caries by means of FTIR,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1124, 2018.
- [100] A. Zlotogorski-Hurvitz, B. Z. Dekel, D. Malonek, R. Yahalom, and M. Vered, “FTIR-based spectrum of salivary exosomes coupled with computational-aided discriminating analysis in the diagnosis of oral cancer,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2019.
- [101] L. M. Rodrigues, L. F. das C. e. S. Carvalho, F. Bonnier, A. L. Anbinder, H. da S. Martinho, and J. D. Almeida, “Evaluation of inflammatory processes by FTIR spectroscopy,” *J. Med. Eng. Technol.*, vol. 42, pp. 228–235, 2018.
- [102] J. Keirsse, “Spectroscopie infrarouge déportée : mise au point d ’ un biocapteur pour l ’ imagerie métabolique et la sécurité microbiologique”, Thèse de l'Université de Rennes 1, 2004.
- [103] S.-Y. Lin, M.-J. Li, and W.-T. Cheng, “FT-IR and Raman vibrational\rmicrospectroscopies used for spectral\rbiodiagnosis of human tissues”, *Spectroscopy*, vol. 21, pp. 1–30, 2007.
- [104] S. A. Mian, C. Yorucu, M. S. Ullah, I. U. Rehman, and H. E. Colley, “Raman spectroscopy can discriminate between normal, dysplastic and cancerous oral mucosa: a tissue-engineering approach,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 11, pp. 3253–3262, 2017.
- [105] S. P. Singh and C. M. Krishna, “In vivo Raman spectroscopic identification of premalignant lesions in oral buccal mucosa lesions in oral buccal mucosa”, *J Biomed Opt* 17(10), 2019.
- [106] U. Bottoni *et al.*, “Infrared saliva analysis of psoriatic and diabetic patients: Similarities in protein components,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 63, pp. 379–384, 2016.
- [107] P. C. Caetano, J. F. Strixino, and L. Raniero, “Analysis of saliva by fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes,” *Rev. Bras. Eng. Biomed.*, vol. 31, pp. 116–124, 2015.
- [108] S. Khaustova, M. Shkurnikov, E. Tonevitsky, V. Artyushenko, and A. Tonevitsky, “Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy,” *Analyst*, vol. 135, pp. 3183–3192, 2010.
- [109] L. C. Lemes, P. C. Caetano Júnior, J. F. Strixino, J. Aguiar, and L. Raniero, “Analysis of serum cortisol levels by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for diagnosis of stress in athletes,” *Rev. Bras. Eng. Biomed.*, vol. 32, pp. 293–300, 2016.
- [110] R. Raziya Sultana, S. N. Zafarullah, and N. Hephzibah Kirubamani, “Utility of FTIR spectroscopic analysis of saliva of diabetic pregnant women in each trimester,” *Indian J. Sci. Technol.*, vol. 4, pp. 967–970, 2011.
- [111] D. A. Scott *et al.*, “Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva,” *Diabetol. Metab. Syndr.*, vol. 2, pp. 1–9, 2010.
- [112] P. Seredin, D. Goloshchapov, Y. Ippolitov, and P. Vongsvivut, “Pathology-specific molecular profiles of saliva in patients with multiple dental caries—potential application for predictive, preventive and personalised medical services,” *EPMA J.*, vol. 9, pp. 195–203, 2018.

- [113] N. Simsek Ozek *et al.*, “Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy,” *J. Dent. Res.*, vol. 95, pp. 1472–1478, 2016.
- [114] H. V. Tran, “Caractérisation des propriétés mécaniques de la peau humaine in vivo via l’IRM,” Thèse de l’Université de Technologie de Compiègne, 2007.
- [115] T. A. Krouskop, T. M. Wheeler, F. Kallel, B. S. Garra, and T. Hall, “Elastic Moduli of Breast and Prostate Tissues under Compression,” *Ultrason. Imaging*, vol. 20, pp. 260–274, 1998.
- [116] J. A. J. Van Der Rijt, K. O. Van Der Werf, M. L. Bennink, P. J. Dijkstra, and J. Feijen, “Micromechanical testing of individual collagen fibrils,” *Macromol. Biosci.*, vol. 6, pp. 697–702, 2006.
- [117] M. C. Kronka, I. S. Watanabe, M. C. Pereira Da Silva, and B. König, “Corrosion casts of young rabbit palatine mucosa angioarchitecture,” *Ann. Anat.*, vol. 182, pp. 529–531, 2000.
- [118] W. L. Kydd and C. H. Daly, “The biologic and mechanical effects of stress on oral mucosa,” *J. Prosthet. Dent.*, vol. 47, pp. 317–329, 1982.
- [119] M. H. Lacoste-Ferré, P. Demont, J. Dandurand, E. Dantras, D. Duran, and C. Lacabanne, “Dynamic mechanical properties of oral mucosa: Comparison with polymeric soft denture liners,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 4, pp. 269–274, 2011.
- [120] J. J. E. Choi *et al.*, “Mechanical properties of human oral mucosa tissues are site dependent: A combined biomechanical, histological and ultrastructural approach,” *Clin. Exp. Dent. Res.*, 2020.
- [121] M. Tanaka, T. Ogimoto, K. Koyano, and T. Ogawa, “Denture wearing and strong bite force reduce pressure pain threshold of edentulous oral mucosa,” *J. Oral Rehabil.*, vol. 31, no. 9, pp. 873–878, 2004.
- [122] A. Isobe, Y. Sato, N. Kitagawa, O. Shimodaira, S. Hara, and S. Takeuchi, “The influence of denture supporting tissue properties on pressure-pain threshold. -Measurement in dentate subjects-,” *J. Prosthodont. Res.*, vol. 57, pp. 275–283, 2013.
- [123] A. Tsaira *et al.*, “Theoretical considerations and a mathematical model for the analysis of the biomechanical response of human keratinized oral mucosa,” *Front. Physiol.*, vol. 7, pp. 1–10, 2016.
- [124] H. H. Bragulla and D. G. Homberger, “Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia,” *J. Anat.*, vol. 214, pp. 516–559, 2009.
- [125] S. Goktas, J. J. Dmytryk, and P. S. McFetridge, “Biomechanical Behavior of Oral Soft Tissues,” *J. Periodontol.*, vol. 82, pp. 1178–1186, 2011.
- [126] R. Tang *et al.*, “Thermal and vibrational characterization of human skin,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 127, pp. 1143–1154, 2017.
- [127] N. Wiegand, L. Vámhidy, and D. Lőrinczy, “Differential scanning calorimetric examination of ruptured lower limb tendons in human,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 101, pp. 487–492, 2010.

- [128] C. A. Miles, N. C. Avery, V. V. Rodin, and A. J. Bailey, “The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres,” *J. Mol. Biol.*, vol. 346, pp. 551–556, 2005.
- [129] V. Samouillan, J. Dandurand, C. Lacabanne, R. J. Thoma, A. Adams, and M. Moore, “Comparison of chemical treatments on the chain dynamics and thermal stability of bovine pericardium collagen,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 64, pp. 330–338, 2003.
- [130] K. R. Heys, M. G. Friedrich, and R. J. W. Truscott, “Free and Bound Water in Normal and Cataractous Human Lenses,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 49, p. 1991, 2008.
- [131] R. Tang *et al.*, “Identification of ageing biomarkers in human dermis biopsies by thermal analysis (DSC) combined with Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR/ATR),” *Skin. Res. Technol.*, vol. 23, pp. 573–580, 2017.
- [132] N. Wiegand, I. Naumov, L. G. Nöt, L. Vámhidy, and D. Lőrinczy, “Differential scanning calorimetric examination of pathologic scar tissues of human skin,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 111, pp. 1897–1902, 2013.
- [133] J. Liu, L. Luo, Y. Hu, F. Wang, X. Zheng, and K. Tang, “Kinetics and mechanism of thermal degradation of vegetable-tanned leather fiber,” *J. Leather Sci. Eng.*, vol. 1, pp. 1–13, 2019.
- [134] H. Trębacz, A. Szczęśna, and M. Arczewska, “Thermal stability of collagen in naturally ageing and in vitro glycated rabbit tissues,” *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 134, no. 3. pp. 1903–1911, 2018.
- [135] Z. Xia, X. Calderon-Colon, M. Trexler, J. Elisseff, and Q. Guo, “Thermal denaturation of type I collagen vitrified gels,” *Thermochim. Acta*, vol. 527, pp. 172–179, 2012.
- [136] D. G. Wallace, R. A. Condell, J. W. Donovan, A. Paivinen, W. M. Rhee, and S. B. Wade, “Multiple denaturational transitions in fibrillar collagen,” *Biopolymers*, vol. 25, pp. 1875–1893, 1986.
- [137] W. Liu, Z. Tian, C. Li, and G. Li, “Thermal denaturation of fish collagen in solution: A calorimetric and kinetic analysis,” *Thermochim. Acta*, vol. 581, pp. 32–40, 2014.
- [138] C. A. Miles and M. Ghelashvili, “Polymer-in-a-Box Mechanism for the Thermal Stabilization of Collagen Molecules in Fibers,” *Biophys. J.*, vol. 76, pp. 3243–3252, 1999.
- [139] C. A. Miles and N. C. Avery, “Thermal stabilization of collagen in skin and decalcified bone,” *Phys. Biol.*, vol. 8, p. 026002, 2011.
- [140] F. Flandin, C. Buffevant, and D. Herbage, “A differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen,” *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 791, pp. 205–211, 1984.
- [141] T. L. Willett, R. S. Labow, and J. M. Lee, “Mechanical overload decreases the thermal stability of collagen in an in vitro tensile overload tendon model,” *J. Orthop. Res.*, vol. 26, pp. 1605–1610, 2008.

- [142] M. Melling *et al.*, “Differential scanning calorimetry, biochemical, and biomechanical analysis of human skin from individuals with diabetes mellitus,” *Anat. Rec.*, vol. 259, pp. 327–333, 2000.
- [143] E. Alanen, T. Lahtinen, and J. Nuutinen, “Penetration of electromagnetic fields of an open-ended coaxial probe between 1 MHz and 1 GHz in dielectric skin measurements,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 44, 1999.
- [144] E. Alanen, T. Lahtinen, and J. Nuutinen, “Measurement of dielectric properties of subcutaneous fat with open-ended coaxial sensors,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 43, pp. 475–485, 1998.
- [145] T. Yamamoto and Y. Yamamoto, “Electrical properties of the epidermal stratum corneum,” *Med. Biol. Eng.*, vol. 14, pp. 151–158, 1976.
- [146] Ø. G. Martinsen, S. Grimnes, and O. Sveen, “Dielectric properties of some keratinised tissues. Part 1: Stratum corneum and nail in situ,” *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 35, pp. 172–176, 1997.
- [147] S. A. Lusceac, M. Rosenstihl, M. Vogel, C. Gainaru, A. Fillmer, and R. Böhmer, “NMR and dielectric studies of hydrated collagen and elastin: Evidence for a delocalized secondary relaxation,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 357, pp. 655–663, 2011.
- [148] Murdoch C *et al.*, “Use of electrical impedance spectroscopy to detect malignant and potentially malignant oral lesions,” *Int J Nanomedicine*, vol. 9, pp. 4521–32, 2014.
- [149] I. Lackovic and Z. Stare, “Low-frequency dielectric properties of the oral mucosa,” *IFMBE Proc.*, vol. 17 IFMBE, pp. 154–157, 2007.
- [150] V. Samouillan *et al.*, “Chain dynamics of human dermis by Thermostimulated currents: A tool for new markers of aging,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 25, pp. 12–19, 2019.
- [151] G. Pascual *et al.*, “New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes,” *Cryobiology*, vol. 48, pp. 62–71, 2004.
- [152] J. Buján *et al.*, “Rapid Thawing Increases the Fragility of the Cryopreserved Arterial Wall,” *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 20, pp. 13–20, 2000.
- [153] C. H. G. Rojas, “Mechanism of Cellular Damage from Cryosurgery,” *Dermatological Cryosurgery and Cryotherapy*, Ed Springer, pp. 37–38, 2016.
- [154] X. He and J. C. Bischof, “Quantification of Temperature and Injury Response in Thermal Therapy and Cryosurgery,” *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 31, no. 5–6, pp. 355–422, 2003.
- [155] M. Madi, M. P. Rols, and L. Gibot, “Efficient In Vitro Electroporation of Reconstructed Human Dermal Tissue,” *J. Membr. Biol.*, vol. 248, pp. 903–908, 2015.
- [156] H. Padh, “Cellular functions of ascorbic acid,” *Biochem. Cell Biol.*, vol. 68, pp. 1166–1173, 1990.
- [157] J. Gehl *et al.*, “Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases,” *Acta Oncol. (Madr.)*, vol. 57, pp. 874–882, 2018.
- [158] V. Samouillan *et al.*, “The Use of Thermal Techniques for the Characterization and Selection of Natural Biomaterials,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 2, pp. 230–248, 2011.

- [159] E. Giorgini *et al.*, “In vitro FTIR microspectroscopy analysis of primary oral squamous carcinoma cells treated with cisplatin and 5-fluorouracil: A new spectroscopic approach for studying the drug-cell interaction,” *Analyst*, vol. 143, pp. 3317–3326, 2018.
- [160] S. Olsztyńska-Janus, A. Pietruszka, Z. Kielbowicz, and M. A. Czarnecki, “ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part I: Temperature effect,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 188, pp. 37–49, 2018.
- [161] W. K. Surewicz, H. H. Mantsch, and D. Chapman, “Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment,” *Biochemistry*, vol. 32, pp. 389–394, 1993.
- [162] V. Zohdi, D. R. Whelan, B. R. Wood, J. T. Pearson, K. R. Bambery, and M. J. Black, “Importance of Tissue Preparation Methods in FTIR Micro-Spectroscopical Analysis of Biological Tissues: ‘Traps for New Users,’” *PLoS One*, vol. 10, p. e0116491, 2015.
- [163] I. Yakimets, N. Wellner, A. C. Smith, R. H. Wilson, I. Farhat, and J. Mitchell, “Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state,” *Polymer (Guildf)*, vol. 46, pp. 12577–12585, 2005.
- [164] G. Güler, E. Acikgoz, N. Ü. Karabay Yavasoglu, B. Bakan, E. Goormaghtigh, and H. Aktug, “Deciphering the biochemical similarities and differences among mouse embryonic stem cells, somatic and cancer cells using ATR-FTIR spectroscopy,” *Analyst*, vol. 143, pp. 1624–1634, 2018.
- [165] K. W. Sanden *et al.*, “The use of Fourier-transform infrared spectroscopy to characterize connective tissue components in skeletal muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.),” *J. Biophotonics*, vol. 12, pp. 1–9, 2019.
- [166] I. Dreissig, S. Machill, R. Salzer, and C. Krafft, “Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 71, pp. 2069–2075, 2009.
- [167] G. E. Menzies *et al.*, “Fourier transform infrared for noninvasive optical diagnosis of oral, oropharyngeal, and laryngeal cancer,” *Transl. Res.*, vol. 163, pp. 19–26, 2014.
- [168] B. R. Wood, “The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues,” vol. 45, pp. 1980–1998, 2016.
- [169] S. Olsztyńska-Janus, Z. Kielbowicz, and M. A. Czarnecki, “ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part II: Near infrared radiation effect,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 202, pp. 93–101, 2018.
- [170] K. J. Payne and A. Veis, “Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies,” *Biopolymers*, vol. 27, no. 11, pp. 1749–1760, 1988.
- [171] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux and J. -M Ruyschaert, “Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 193, pp. 409–420, 1990.
- [172] O. S. Rabotyagova, P. Cebe, and D. L. Kaplan, “Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 8, pp. 1420–1429, 2008.

- [173] P. T. T. Wong, S. Lacelle, M. F. K. Fung, M. Senterman, and N. Z. Mikhael, “Characterization of exfoliated cells and tissues from human endocervix and ectocervix by FTIR and ATR/FTIR Spectroscopy,” *Biospectroscopy*, vol. 1, pp. 357–364, 1995.
- [174] I. I. Patel *et al.*, “Infrared microspectroscopy identifies biomolecular changes associated with chronic oxidative stress in mammary epithelium and stroma of breast tissues from healthy young women,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 15, pp. 225–235, 2014.
- [175] H. Ukkonen *et al.*, “Oral mucosal epithelial cells express the membrane anchored mucin MUC1,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 73, pp. 269–273, 2017.
- [176] M. Kreuzer, T. Dučić, M. Hawlina, and S. Andjelic, “Synchrotron-based FTIR microspectroscopy of protein aggregation and lipids peroxidation changes in human cataractous lens epithelial cells,” *Sci. Rep.*, vol. 10, pp. 1–14, 2020.
- [177] D. Puett, “DTA and heats of hydration of some polypeptides,” *Biopolymers*, vol. 5, pp. 327–330, 1967.
- [178] J. Dandurand, V. Samouillan, M. H. Lacoste-Ferre, C. Lacabanne, B.Bochicchio, and A. Pepe, “Conformational and thermal characterization of a synthetic peptidic fragment inspired from human tropoelastin: Signature of the amyloid fibers,” *Pathol. Biol.*, vol. 62, pp. 100–107, 2014.
- [179] J. N. Hay and P. R. Laity, “Observations of water migration during thermoporometry studies of cellulose films,” *Polymer.*, vol. 41, pp. 6171–6180, 2000.
- [180] Q. Zhang *et al.*, “Raman microspectroscopic and dynamic vapor sorption characterization of hydration in collagen and dermal tissue,” *Biopolymers*, vol. 95, pp. 607–615, 2011.
- [181] W. Q. Sun, “Dielectric Relaxation of Water and Water-Plasticized Biomolecules in Relation to Cellular Water Organization, Cytoplasmic Viscosity, and Desiccation Tolerance in Recalcitrant Seed Tissues,” *Plant Physiol.*, vol. 124, pp. 1203–1216, 2002.
- [182] G. Kerch, J. Zicans, R. Merijs Meri, A. Stunda-Ramava, and E. Jakobsons, “The use of thermal analysis in assessing the effect of bound water content and substrate rigidity on prevention of platelet adhesion,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 120, pp. 533–539, 2015.
- [183] M. Fujita and J. Okazaki, “Glycosaminoglycans in the lamina propria and submucosal layer of the monkey palatal mucosa.,” *J. Osaka Dent. Univ.*, vol. 26, pp. 67–77, 1992.
- [184] Y. Kaya, Ö. Alkan, E. A. Alkan, and S. Keskin, “Gingival thicknesses of maxillary and mandibular anterior regions in subjects with different craniofacial morphologies,” *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, vol. 154, pp. 356–364, 2018.
- [185] K. Babita, V. Kumar, V. Rana, S. Jain, and A. Tiwary, “Thermotropic and Spectroscopic Behavior of Skin: Relationship with Percutaneous Permeation Enhancement,” *Curr. Drug Deliv.*, vol. 3, pp. 95–113, 2006.
- [186] C. A. Miles, T. V. Burjanadze, and A. J. Bailey, “The Kinetics of the Thermal Denaturation of Collagen in Unrestrained Rat Tail Tendon Determined by Differential Scanning Calorimetry,” *J. Mol. Biol.*, vol. 245, pp. 437–446, 1995.
- [187] E. Badea, G. Della Gatta, and P. Budrugaec, “Characterisation and evaluation of the environmental impact on historical parchments by differential scanning calorimetry,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 104, pp. 495–506, 2011.

- [188] V. L. Shnyrov, V. C. Lubsandorzheva, G. G. Zhadan, and E. A. Permyakov, “Multi-stage nature of the thermal denaturation process in collagen.,” *Biochem. Int.*, vol. 26, pp. 211–7, 1992.
- [189] M. E. Latorre, D. E. Velázquez, and P. P. Purslow, “Differences in the energetics of collagen denaturation in connective tissue from two muscles,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 113, pp. 1294–1301, 2018.
- [190] W. Q. Sun and P. Leung, “Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation,” *Acta Biomater.*, vol. 4, pp. 817–826, 2008.
- [191] P. Budrugaec, “Phase transitions of a parchment manufactured from deer leather,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 120, pp. 103–112, 2015.
- [192] V. Samouillan *et al.*, “The Use of Thermal Techniques for the Characterization and Selection of Natural Biomaterials,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 2, pp. 230–248, 2011.
- [193] G. I. Tseretely and O. I. Smirnova, “DSC study of melting and glass transition in gelatins,” *J. Therm. Anal.*, vol. 38, pp. 1189–1201, 1992.
- [194] S. Ramadan, N. Paul, and H. E. Naguib, “Standardized static and dynamic evaluation of myocardial tissue properties,” *Biomed. Mater.*, vol. 12, 2017.
- [195] S. Nicolle and J. F. Paliérne, “Dehydration effect on the mechanical behaviour of biological soft tissues: Observations on kidney tissues,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 3, pp. 630–635, 2010.
- [196] S. Ramadan, N. Paul, and H. E. Naguib, “Standardized static and dynamic evaluation of myocardial tissue properties,” *Biomed. Mater.*, vol. 12, 2017.
- [197] B. Pearson and D. M. Espino, “Effect of hydration on the frequency-dependent viscoelastic properties of articular cartilage,” *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, vol. 227, pp. 1246–1252, 2013.
- [198] C. Ober, V. Samouillan, M. H. Lacoste-Ferré, J. Dandurand, and C. Lacabanne, “Thermal and vibrational biomarkers of porcine oral mucosa: Influence of localization on hydric organization and physical structure,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2020.
- [199] D. Garrod and M. Chidgey, “Desmosome structure, composition and function,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1778, pp. 572–587, 2008.
- [200] N. Light, A. E. Champion, C. Voyle, and A. J. Bailey, “The rôle of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles,” *Meat Sci.*, vol. 13, pp. 137–149, 1985.
- [201] T. B. Goudoulas and N. Germann, “Phase transition kinetics and rheology of gelatin-alginate mixtures,” *Food Hydrocoll.*, vol. 66, pp. 49–60, 2017.
- [202] S. Abasi, R. Davis, D. A. Podstawczyk, and A. Guiseppi-Elie, “Distribution of water states within Poly(HEMA-co-HPMA)-based hydrogels,” *Polymer.*, vol. 185, p. 121978, 2019.
- [203] A. J. Argyropoulos *et al.*, “Alterations of dermal connective tissue collagen in diabetes: Molecular basis of aged-appearing skin,” *PLoS One*, vol. 11, no. 4, pp. 1–17, 2016.
- [204] J. C. Greene and J. R. Vermillion, “The oral hygiene index: a method for classifying oral hygiene status,” *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 61, pp. 172–179, 1960.

- [205] P. Bercy and H. Tenenbaum, “Parodontologie: Du diagnostic à la pratique”, De Boeck Supérieur, p. 288, 1996.
- [206] J. M. Chalmers, P. L. King, A. J. Spencer, F. A. C. Wright, and K. D. Carter, “The Oral Health Assessment Tool - Validity and reliability,” *Aust. Dent. J.*, vol. 50, pp. 191–199, 2005.
- [207] G. W. Taylor and W. S. Borgnakke, “Periodontal disease: Associations with diabetes, glycemic control and complications,” *Oral Diseases*, vol. 14, pp. 191–203, 2008.
- [208] Y. Haïkel and D. Selimovic, “Diabète et santé bucco-dentaire” Médecine des maladies Métaboliques, vol. 1, pp. 43–49, 2007.
- [209] Haute Autorité de Santé (HAS), “Synthese, Guide Parcours De Soins Diabete De Type 2 De L’Adulte,” *Haute Autorité de Santé*, pp. 1–5, 2014.
- [210] B.-M. Folliguet, “Prévention bucco-dentaire chez les personnes âgées”, *Direction Générale de la Santé SD2B*, pp. 1–47, 2006.
- [211] L. M. Rodrigues, T. D. Magrini Alva, H. da Silva Martinho, and J. D. Almeida, “Analysis of saliva composition in patients with burning mouth syndrome (BMS) by FTIR spectroscopy,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 100, pp. 195–201, 2019.
- [212] L. V. Bel’skaya, E. A. Sarf, and I. A. Gundyrev, “Study of the IR Spectra of the Saliva of Cancer Patients,” *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 85, pp. 1076–1084, 2019.
- [213] L. V. Bel’skaya, E. A. Sarf, and N. A. Makarova, “Use of Fourier Transform IR Spectroscopy for the Study of Saliva Composition,” *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 85, pp. 445–451, 2018.
- [214] D. R. Paschotto, B. Pupin, T. T. Bhattacharjee, and L. E. S. Soares, “Saliva preparation method exploration for ATR-FTIR spectroscopy: Towards bio-fluid based disease diagnosis,” *Anal. Sci.*, vol. 36, pp. 1059–1064, 2020.
- [215] C. Paluszkiwicz *et al.*, “Saliva as a first-line diagnostic tool: A spectral challenge for identification of cancer biomarkers,” *J. Mol. Liq.*, vol. 307, 2020.
- [216] R. P. Rodrigues *et al.*, “Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis,” *Braz. Dent. J.*, vol. 30, pp. 437–445, 2019.
- [217] K. Senevirathna, N. Jayawardana, R. Jayasinghe, and U. Perera, “Diagnostic Value of FTIR Spectroscopy, Metabolomic Screening and Molecular Genetics in Saliva for Early Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC),” *Med. Clin. Res.*, vol. 6, 2020.
- [218] A. Martinez-Cuazitl *et al.*, “ATR-FTIR spectrum analysis of saliva samples from COVID-19 positive patients,” *Scientific Reports*, vol. 11, 2021.
- [219] S. Sharma and R. Singh, “Detection and discrimination of seminal fluid using attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR FT-IR) spectroscopy combined with chemometrics,” *Int. J. Legal Med.*, pp. 411–432, 2019.
- [220] K. L. Reigle *et al.*, “Non-enzymatic glycation of type I collagen diminishes collagen-proteoglycan binding and weakens cell adhesion,” *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 104, pp. 1684–1698, 2008.

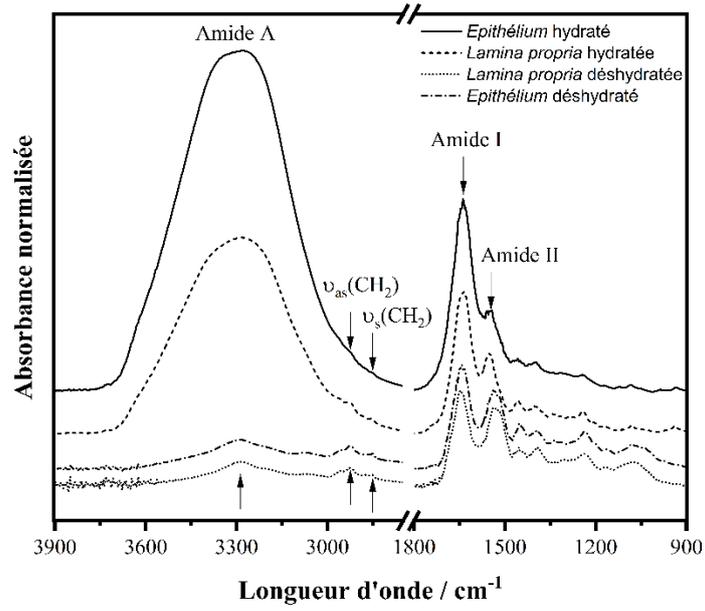
- [221] C. Praillet, J. A. Grimaud, and H. Lortat-Jacob, “Les Proteoglycanes I. Molecules Aux Multiples Fonctions - Futures Molecules Therapeutiques?,” *Medecine/Sciences*, vol. 14, pp. 412–420, 1998.
- [222] C. Praillet, J. Grimaud, and H. Lortat-Jacob, “Les protéoglycanes. (II) Rôles en pathologie.,” *Médecine/Sciences*, vol. 14, p. 421, 1998.
- [223] “Obésité et diabète de type 2”, *Activité physique: Prévention et traitement des maladies chroniques*, iPubli, Inserm.
- [224] F. Xu, L. Laguna, and A. Sarkar, “Aging-related changes in quantity and quality of saliva: Where do we stand in our understanding?,” *J. Texture Stud.*, vol. 50, pp. 27–35, 2019.
- [225] S. Séguier, G. Godeau, and N. Brousse, “Collagen Fibers and Inflammatory Cells in Healthy and Diseased Human Gingival Tissues: A Comparative and Quantitative Study by Immunohistochemistry and Automated Image Analysis,” *J. Periodontol.*, vol. 71, pp. 1079–1085, 2000.
- [226] A.-L. Ejeil, S. Igondjo-Tchen, S. Ghomrasseni, B. Pellat, G. Godeau, and B. Gogly, “Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Healthy and Diseased Human Gingiva,” *J. Periodontol.*, vol. 74, pp. 188–195, 2003.
- [227] M. Melling *et al.*, “Differential scanning calorimetry, biochemical, and biomechanical analysis of human skin from individuals with diabetes mellitus,” *Anatomical Record*, vol. 259, pp. 327–333, 2000.
- [228] S. Sakai, K. Kikuchi, J. Satoh, H. Tagami, and S. Inoue, “Functional properties of the stratum corneum in patients with diabetes mellitus: Similarities to senile xerosis,” *Br. J. Dermatol.*, vol. 153, pp. 319–323, 2005.
- [229] M. Kreuzer, T. Dučić, M. Hawlina, and S. Andjelic, “Synchrotron-based FTIR microspectroscopy of protein aggregation and lipids peroxidation changes in human cataractous lens epithelial cells,” *Scientific Reports*, vol. 10, 2020.
- [230] C. M. O. Volpe, P. H. Villar-Delfino, P. M. F. Dos Anjos, and J. A. Nogueira-Machado, “Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications review-Article,” *Cell Death and Disease*, vol. 9, 2018.
- [231] W. M. Thomson, J. M. Chalmers, A. J. Spencer, and G. D. Slade, “Medication and dry mouth: Findings from a cohort study of older people,” *J. Public Health Dent.*, vol. 60, pp. 12–20, 2000.
- [232] D. Muster, J. Valfrey, and H. Kuntzmann, “Médicaments psychotropes en stomatologie et en odontologie,” *EMC - Stomatol.*, vol. 1, pp. 175–192, 2005.
- [233] B. Rigas, S. Morgello, I. S. Goldman, and P. T. T. Wong, “Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, pp. 8140–8144, 1990.
- [234] S. Gouarderes *et al.*, “Pulsed electric fields induce extracellular matrix remodeling through MMP activation and decreased collagen production,” *J. Invest. Dermatol.*, Nature Publishing Group, 2021.

- [235] L. Magnan *et al.*, “Characterization of a Cell-Assembled extracellular Matrix and the effect of the devitalization process,” *Acta Biomater.*, vol. 82, pp. 56–67, 2018.
- [236] J. J. Lovekamp, D. T. Simionescu, J. J. Mercuri, B. Zubiato, M. S. Sacks, and N. R. Vyavahare, “Stability and function of glycosaminoglycans in porcine bioprosthetic heart valves,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 1507–1518, 2006.
- [237] J. M. Lee, C. A. Pereira, D. Abdulla, W. A. Naimark, and I. Crawford, “A multi-sample denaturation temperature tester for collagenous biomaterials,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 17, pp. 115–121, 1995.

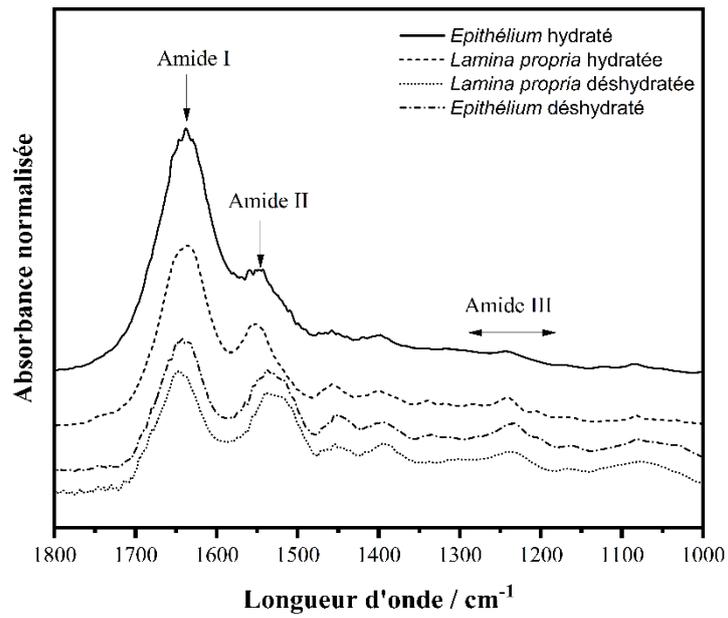
Annexes

N°PATIENT	CLASSE D'AGE	ANALYSES EFFECTUEES SUR MUQUEUSES	ANALYSES EFFECTUEES SUR SALIVES
1A	Agés		
2A	Agés		
3A	Agés		
4A	Agés		
5A	Agés		
6A	Agés		
7A	Agés		
8A	Agés		
9A	Agés		
10A	Agés	Echantillons muqueux pour IRTF et ACD (x21 patients âgés)	
11A	Agés		
12A	Agés		
13A	Agés		
14A	Agés		
15A	Agés		
16A	Agés		
17A	Agés		
18A	Agés		
19A	Agés		
20A	Agés		Echantillons salivaires pour IRTF (x31 patients)
22A	Agés		
21A	Agés	Echantillons muqueux pour IRTF et AMD (x 12 patients âgés)	
23A	Agés		
24A	Agés		
25A	Agés		
26A	Agés		
27A	Agés		
28A	Agés		
29A	Agés		
30A	Agés		
31A	Agés		
32A	Agés		
33A	Agés		
1J	Jeunes	Echantillons muqueux pour IRTF et ACD (x5 patients jeunes)	
2J	Jeunes		
3J	Jeunes		
4J	Jeunes		
5J	Jeunes		

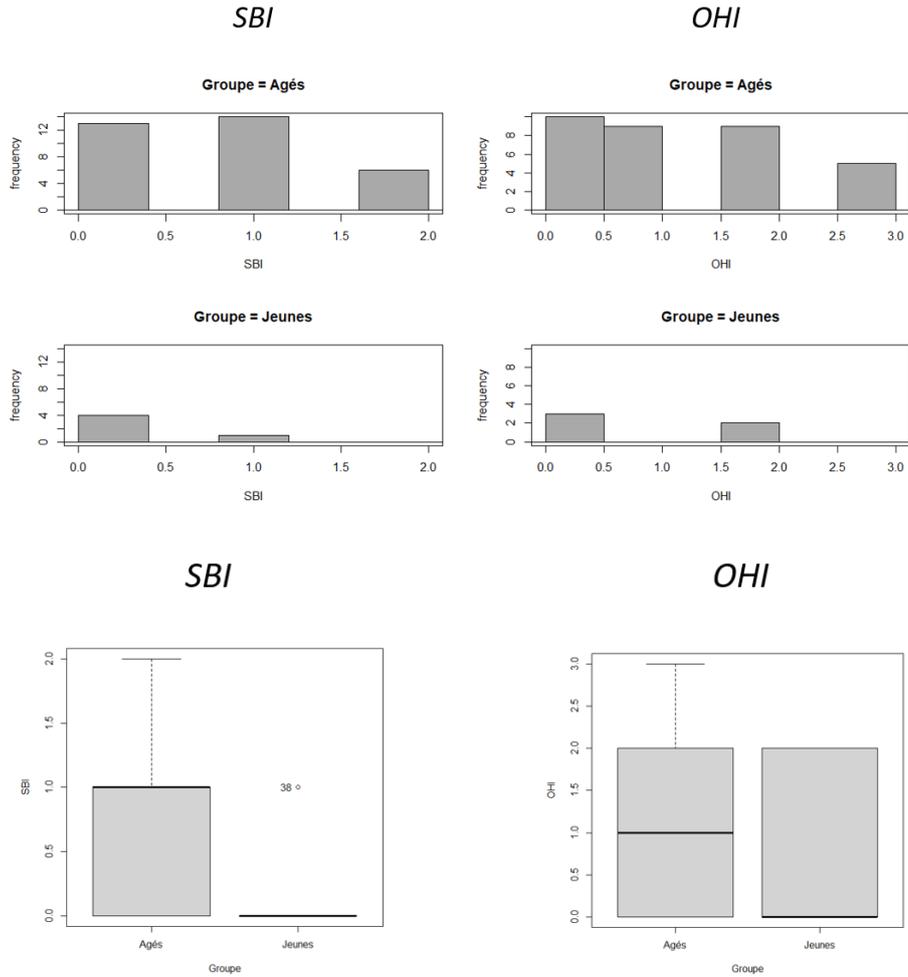
Annexe 1: Tableau récapitulatif des échantillons analysés dans le cadre de l'étude clinique



Annexe 2: Spectres moyens de la muqueuse buccale mandibulaire dans la zone [3900-900 cm^{-1}]



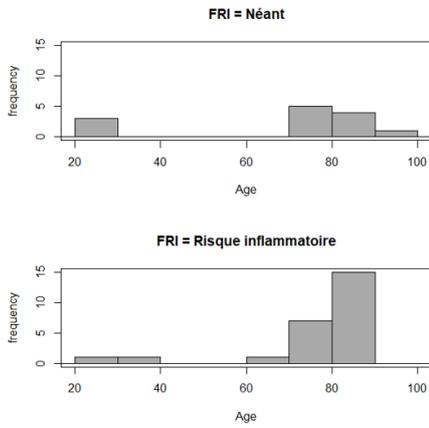
Annexe 3: Spectres moyens de la muqueuse buccale mandibulaire dans la zone [1800-1000 cm^{-1}]



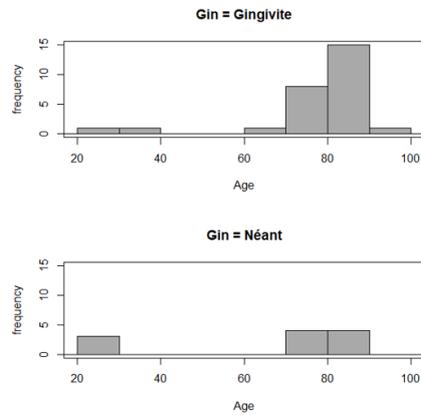
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
OHI	0.8674	0.00647 (jeunes)/ 0.0006401 (âgés)
SBI	0.1042	0.000131 (jeunes)/ 0.00002646 (âgés)

Annexe 4: Distribution, boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité pour les indices OHI et SBI en fonction des classes d'âge

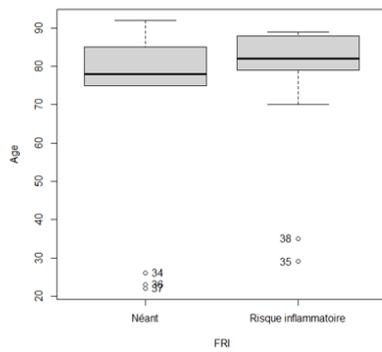
Facteur de risque inflammatoire
OHI = 0 (Néant) ; OHI > 0 (Facteur de risque inflammatoire)



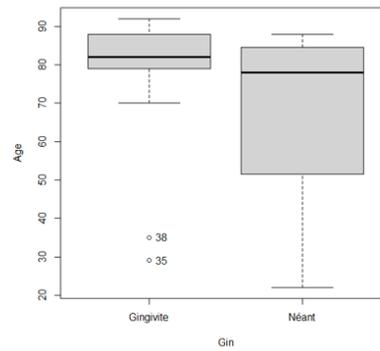
Gingivite
OHI et SBI = 0 (Néant); OHI et SBI > 0 (Gingivite)



Facteur de risque inflammatoire
OHI = 0 (Néant) ; OHI > 0 (Facteur de risque inflammatoire)

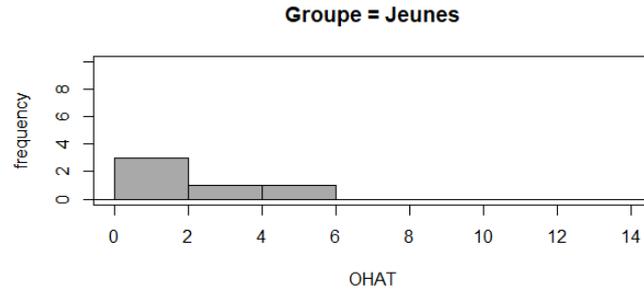
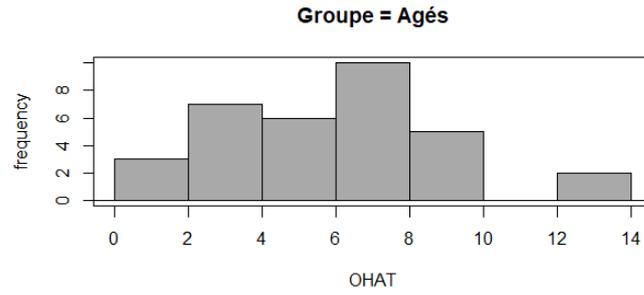


Gingivite
OHI et SBI = 0 (Néant); OHI et SBI > 0 (Gingivite)



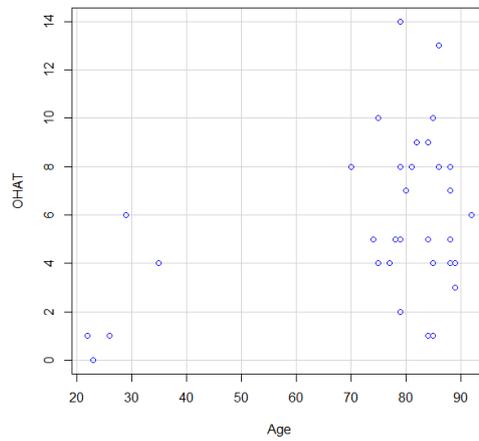
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Facteur de risques inflammatoires	0.01072	0.0000006462 (oui)/ 0.0006668 (non)
Gingivite	0.001961	0.0000006853 (oui) /0.00039 (non)

Annexe 5: Distribution, boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité pour les facteurs de risques inflammatoires et la gingivite en fonction des classes d'âge



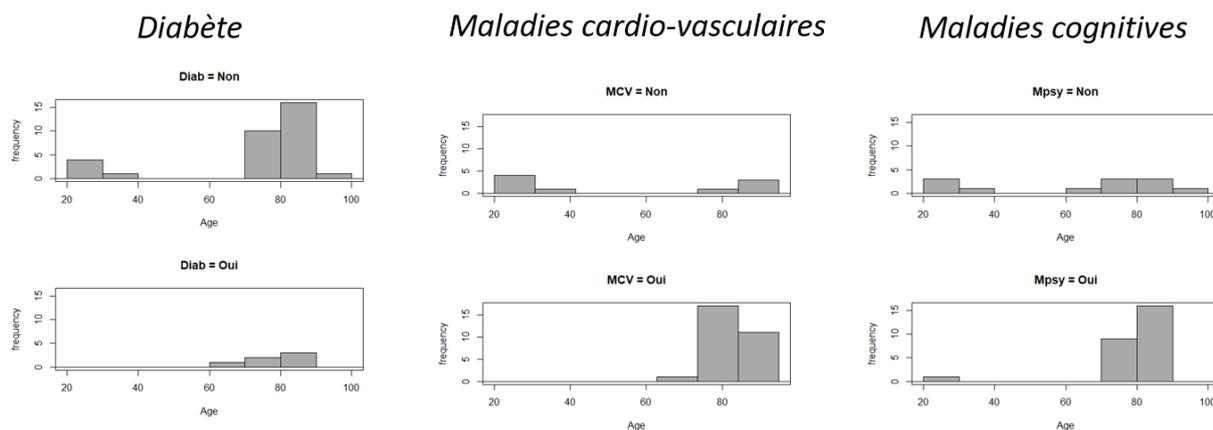
	Homogénéité des variances	Normalité
P value	0.627	0.2812 (agés) / 0.314 (jeunes)

Annexe 6: Distribution, test d'homogénéité des variances et test de normalité pour le score OHAT en fonction des classes d'âge



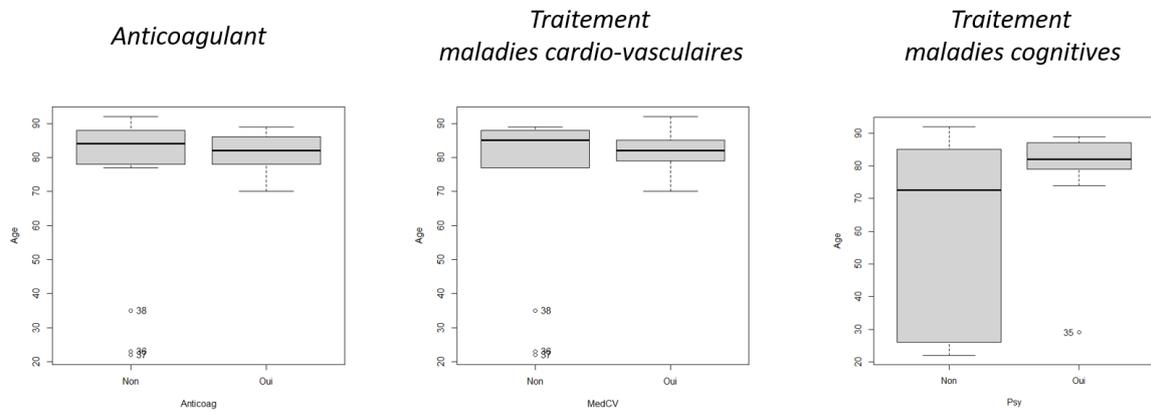
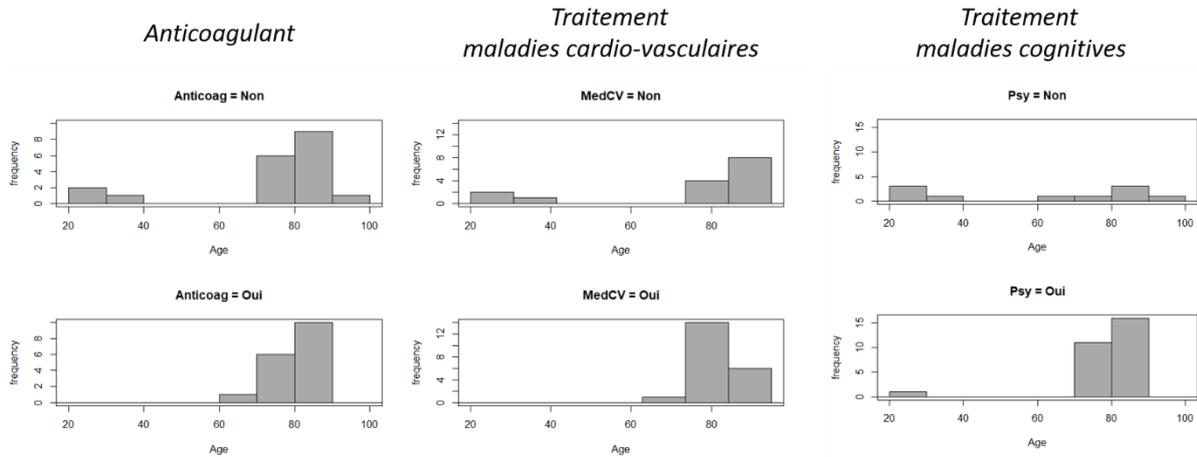
Corrélation entre le score OHAT et l'âge	Spearman		Pearson	
	p-value	Coefficient de corrélation	p-value	Coefficient de corrélation
	0.1997	0.212755	0.01041	0.4108047

Annexe 7: Nuage de point, et tests de corrélation entre le score OHAT et l'âge



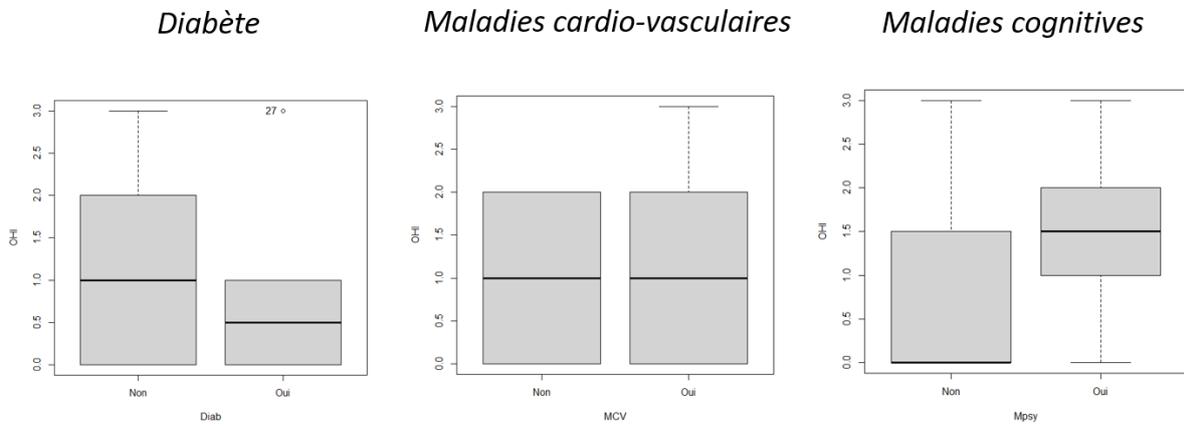
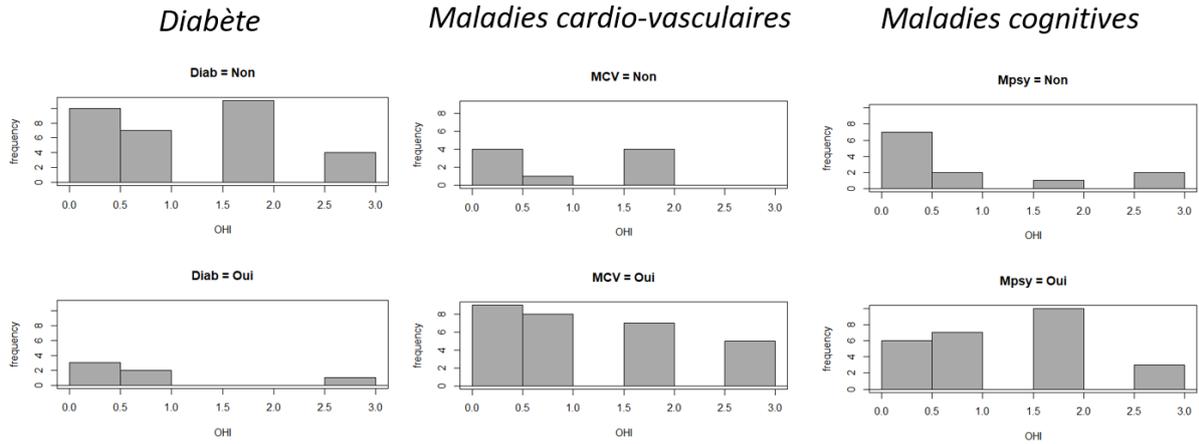
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Diabète	0.1362	0.2502 (oui)/ 0.0000001656 (non)
Troubles psycho-cognitifs	0.000008737	0.00000005319 (oui)/ 0.01209 (non)
Maladies cardiovasculaires	< 2.2e-16	0.5624 (oui) / 0.00545 (non)

Annexe 8: Distribution, test d'homogénéité des variances et test de normalité pour l'âge en fonction des pathologies



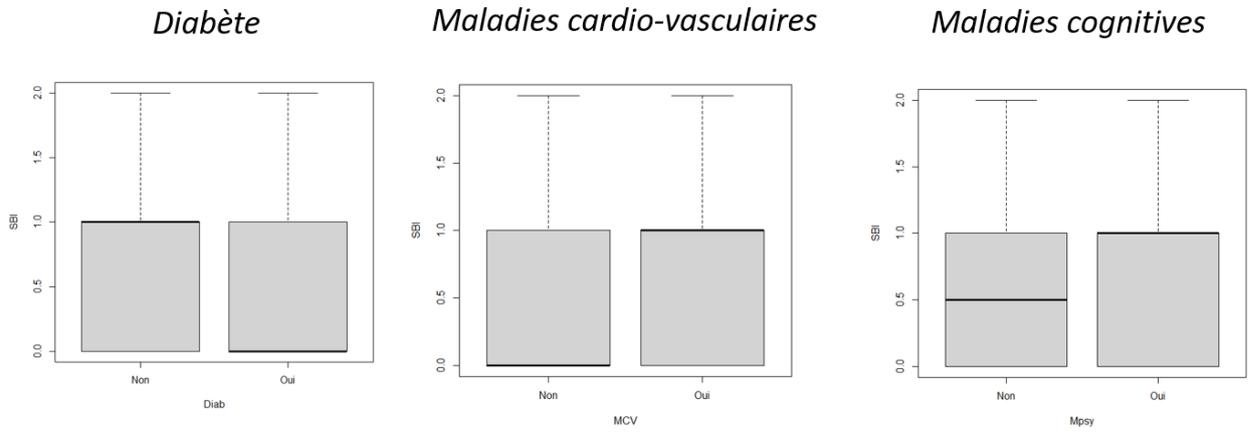
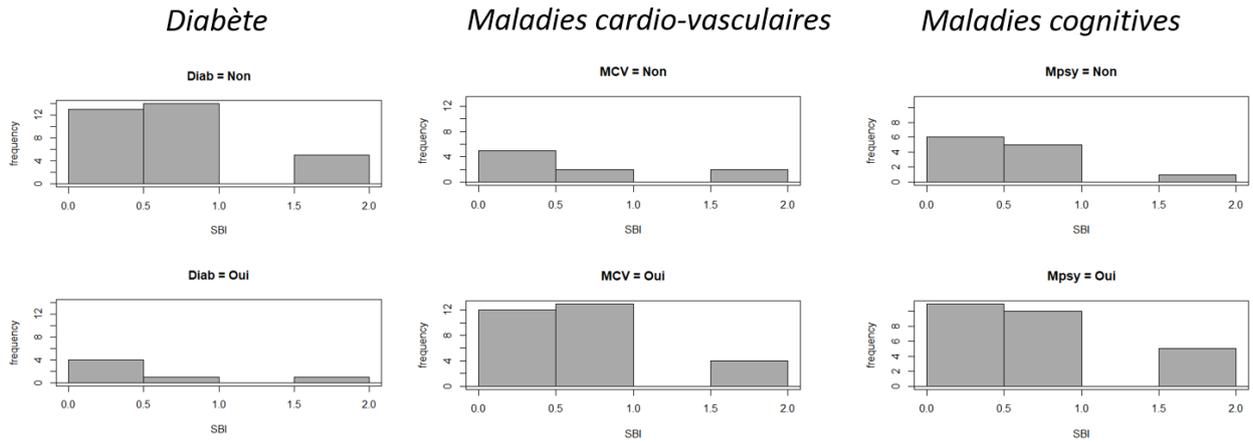
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Traitement maladies cardiovasculaires	0.0002125	0.9885 (oui)/ 0.00008855 (non)
Traitement Troubles psycho-cognitifs	0.000000412	0.00000004655 (oui)/ 0.02135 (non)
Anticoagulants	0.008226	0.5063 (oui) / 0.00001265 (non)

Annexe 9: Distribution, boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité pour l'âge en fonction des aux traitements médicamenteux



Indice OHI	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Diabète	0.6993	0.03294 (oui)/ 0.0005156 (non)
Troubles psychocognitifs	0.4945	0.004139 (oui)/ 0.001346 (non)
Maladies cardiovasculaires	0.7718	0.001108 (oui) / 0.002968 (non)

Annexe 10: Distribution, boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité pour l'OHI en fonction des pathologies



Indice SBI	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Diabète	0.7304	0.006373 (oui)/ 0.00002672 (non)
Troubles psycho-cognitifs	0.5846	0.0001214 (oui)/ 0.004182 (non)
Maladies cardiovasculaires	0.2982	0.0000473 (oui) / 0.005206 (non)

Annexe 11: Distribution, boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité pour l'indice SBI en fonction des pathologies

Variance (p-value)	
Traitement maladies cardiovasculaires	indépendant
Traitement troubles psycho-cognitifs	0.05942
Anticoagulants	indépendant

Annexe 12: Détermination de la dépendance entre la sécheresse buccale et les traitements médicamenteux

Variance (p-value)	
Gingivite	indépendant
Facteurs de risques inflammatoires	indépendant

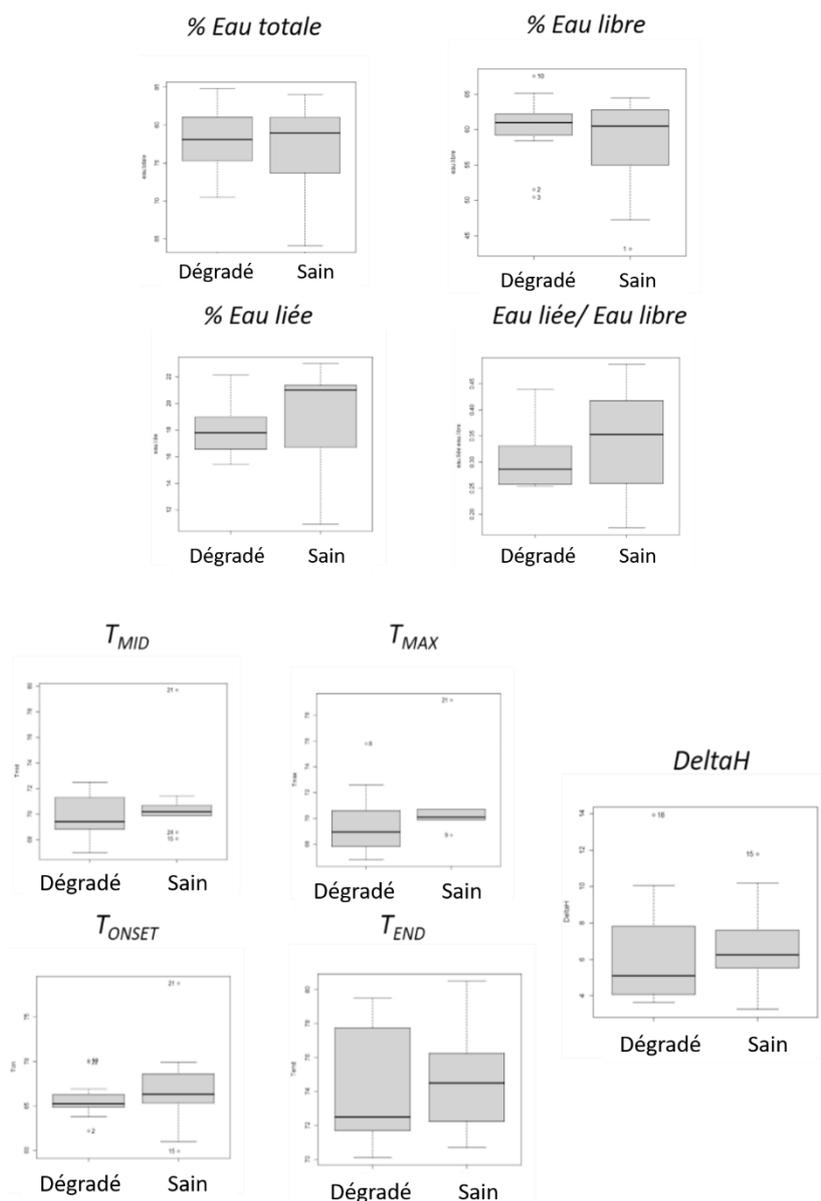
Annexe 13: Détermination de la dépendance entre les signes cliniques locaux et la localisation du prélèvement

	Eau totale (%)	Eau libre (%)	Eau liée (%)	Eau liée/Eau libre	Tonset (°C)	Tmax (°C)	Tmid (°C)	Tend (°C)	DeltaH (J/g)
Minimum	64.1	38.4	10.9	0.173	59.9	66.8	67	70.1	3.25
1^{er} quartile	75	58.4	16.5	0.259	65.0	68.6	68.9	71.9	4.23
Médiane	78	60.1	18	0.287	65.4	70	70.2	74.5	6.13
Moyenne	77.1	58.2	18.8	0.334	67.2	71.0	71.16	75.17	6.52
3^{ème} quartile	81	62.1	21	0.368	69.2	70.7	71.56	78.65	7.70
Maximum	84.8	67.5	30.4	0.762	79.8	80.2	80.6	83.4	13.94

Annexe 14: Distribution des marqueurs thermiques

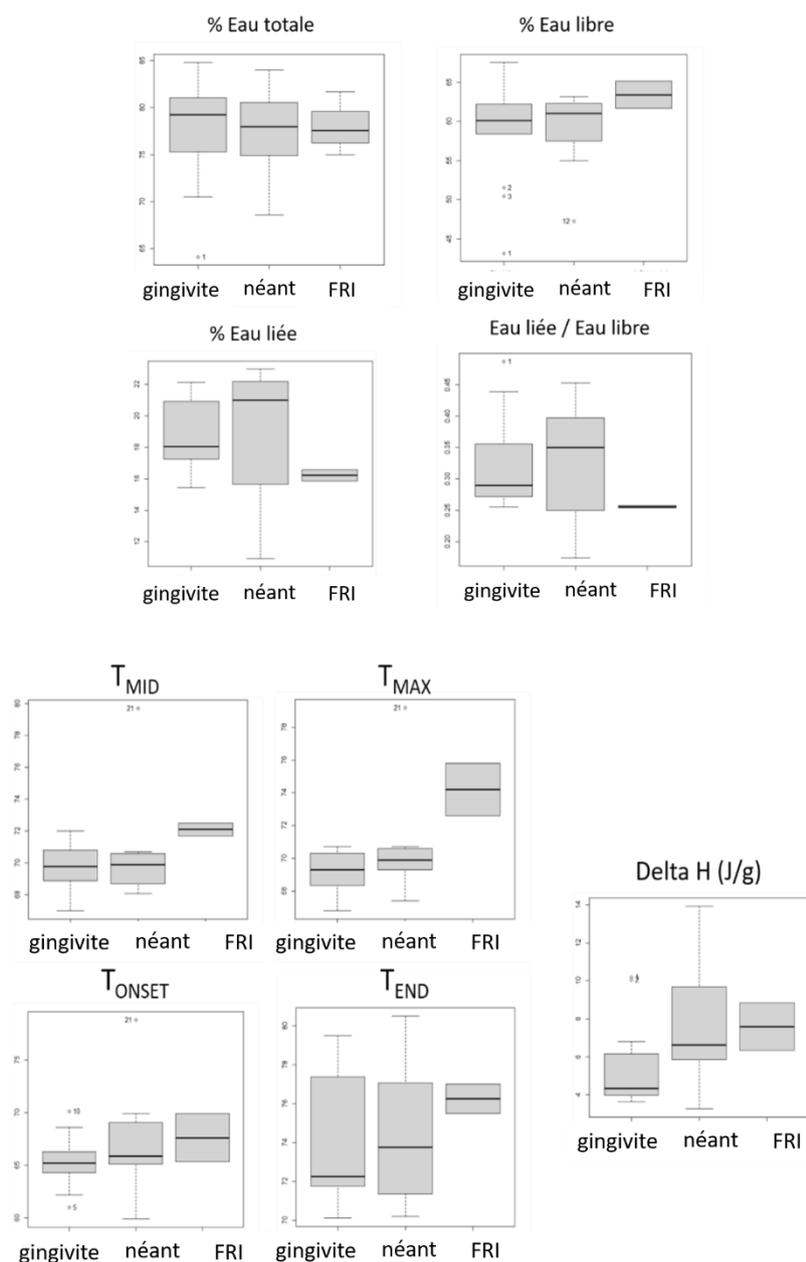
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value) âgés/jeunes	
Eau libre (%)	0.1934	0.00459	0.369
Eau liée (%)	0.2895	0.5485	0.02386
Eau totale (%)	0.2915	0.2143	0.9937
Eau liée/Eau libre	0.1286	0.0221	0.3742
Tonset (°C)	0.08729	0.1697	0.05567
Tmax (°C)	0.08464	0.01098	0.1799
Tend (°C)	0.4041	0.01669	0.3992
Tmid (°C)	0.004931	0.8999	0.4183
DeltaH (J/g)	0.2012	0.01999	0.3471

Annexe 15: Test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction de la classe d'âge



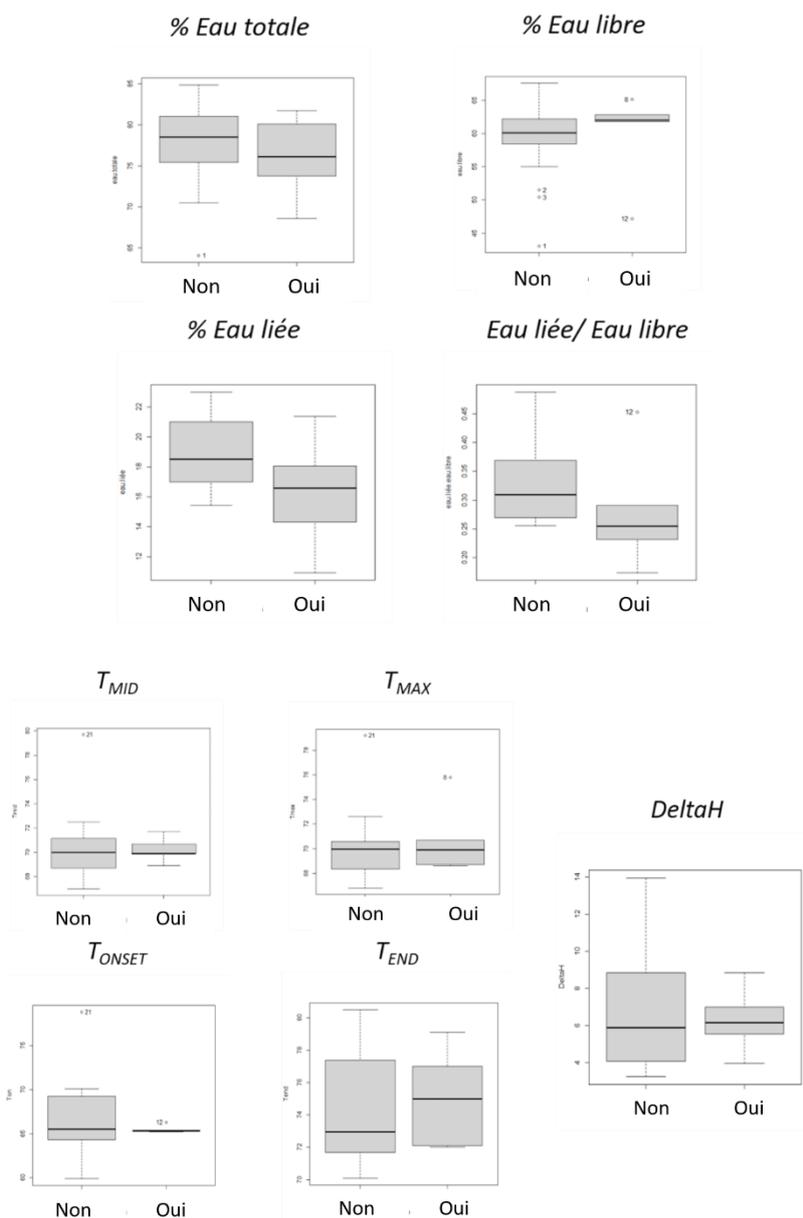
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Tonset (°C)	0.0718	0.009256
Tmax (°C)	0.8965	0.0009133
Tend (°C)	0.47	0.053
Tmid (°C)	0.4539	0.0002374
DeltaH (J/g)	0.6662	0.02448
Eau libre (%)	0.153	0.004139
Eau liée (%)	0.008922	0.4069
Eau totale (%)	0.1507	0.0964
Eau liée/Eau libre	0.03055	0.193

Annexe 16: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction du score OHAT



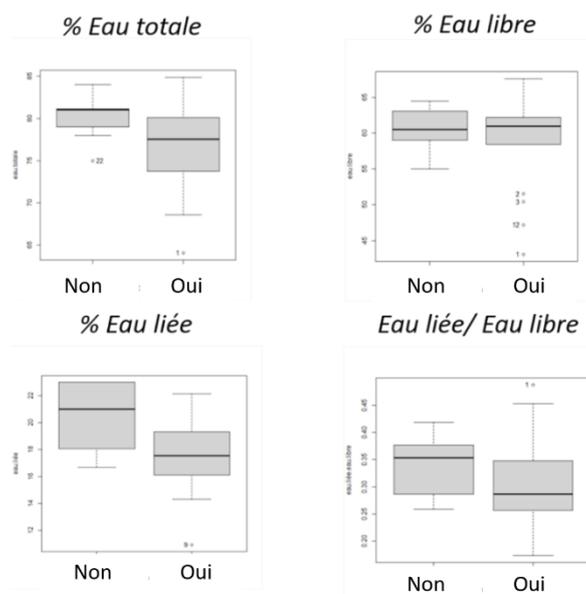
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Tonset (°C)	0.3232	0.009256
Tmax (°C)	0.5638	0.0009133
Tend (°C)	0.2297	0.053
Tmid (°C)	0.3591	0.0002374
DeltaH (J/g)	0.5265	0.02448
Eau libre (%)	0.6505	0.004139
Eau liée (%)	0.00259	0.4069
Eau totale (%)	0.688	0.0964
Eau liée/Eau libre	0.04917	0.193

Annexe 17: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction des signes cliniques locaux inflammatoires



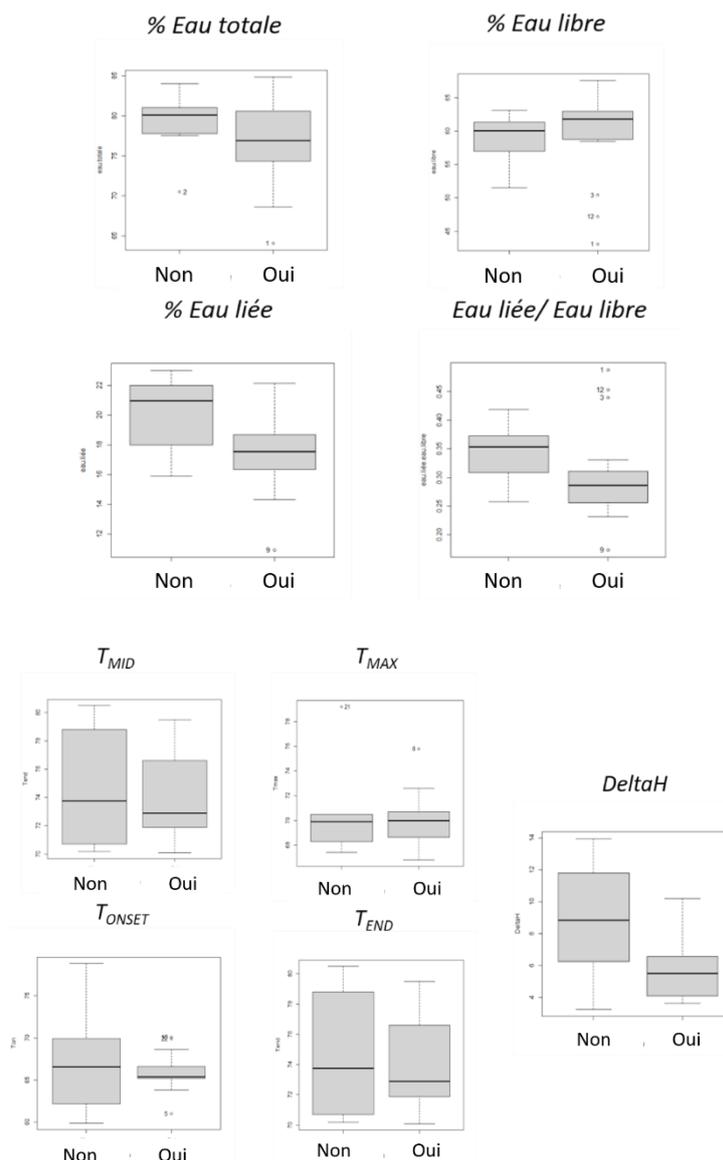
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Tonset (°C)	0.03861	0.009256
Tmax (°C)	0.7917	0.0009133
Tend (°C)	0.503	0.053
Tmid (°C)	0.2915	0.0002374
DeltaH (J/g)	0.1688	0.02448
Eau libre (%)	0.6332	0.004139
Eau liée (%)	0.3	0.4069
Eau totale (%)	0.8477	0.0964
Eau liée/Eau libre	0.5079	0.193

Annexe 18: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction du diabète



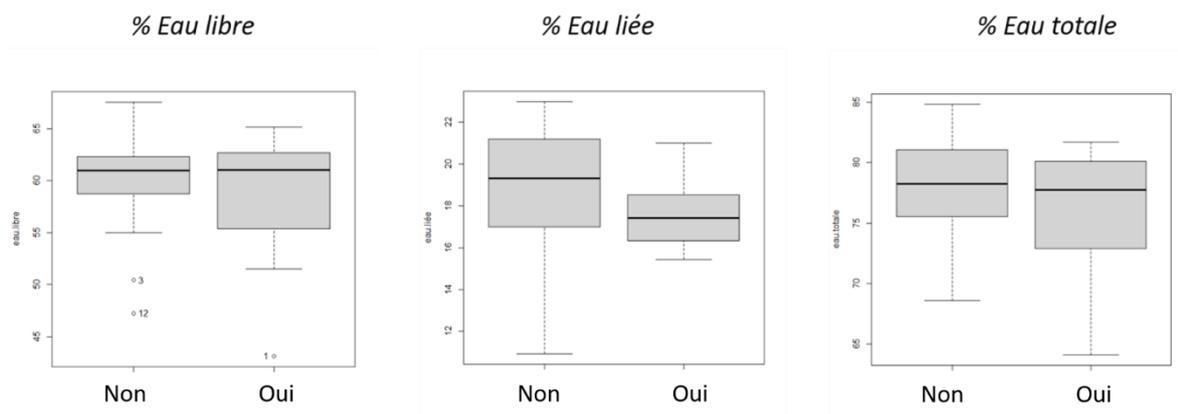
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Tonset (°C)	0.05647	0.009256
Tmax (°C)	0.2592	0.0009133
Tend (°C)	0.5658	0.053
Tmid (°C)	0.05922	0.0002374
DeltaH (J/g)	0.1311	0.02448
Eau libre (%)	0.1585	0.004139
Eau liée (%)	0.9241	0.4069
Eau totale (%)	0.1311	0.0964
Eau liée/Eau libre	0.3335	0.193

Annexe 19: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction des maladies cardiovasculaires



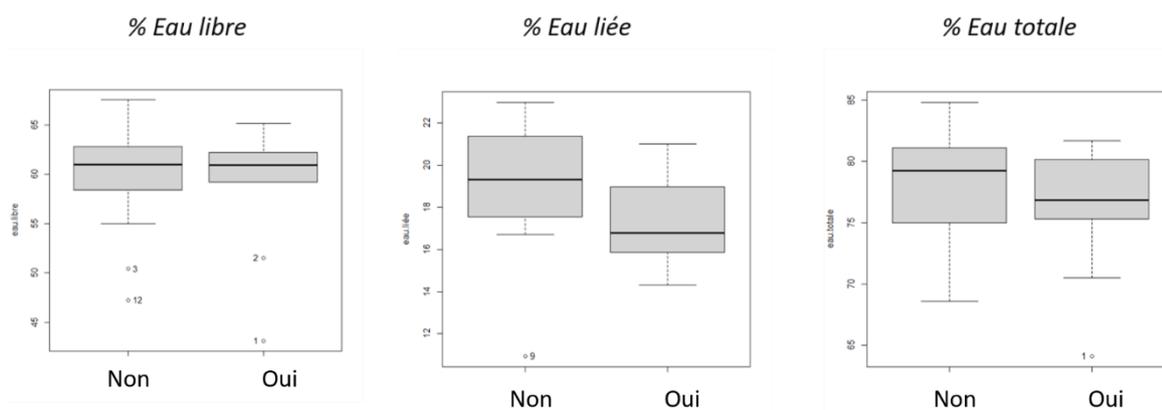
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Tonset (°C)	0.009879	0.009256
Tmax (°C)	0.2093	0.0009133
Tend (°C)	0.4022	0.053
Tmid (°C)	0.05085	0.0002374
DeltaH (J/g)	0.0261	0.02448
Eau libre (%)	0.2153	0.004139
Eau liée (%)	0.9208	0.4069
Eau totale (%)	0.3536	0.0964
Eau liée/Eau libre	0.245	0.193

Annexe 20: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction des troubles psycho-cognitifs



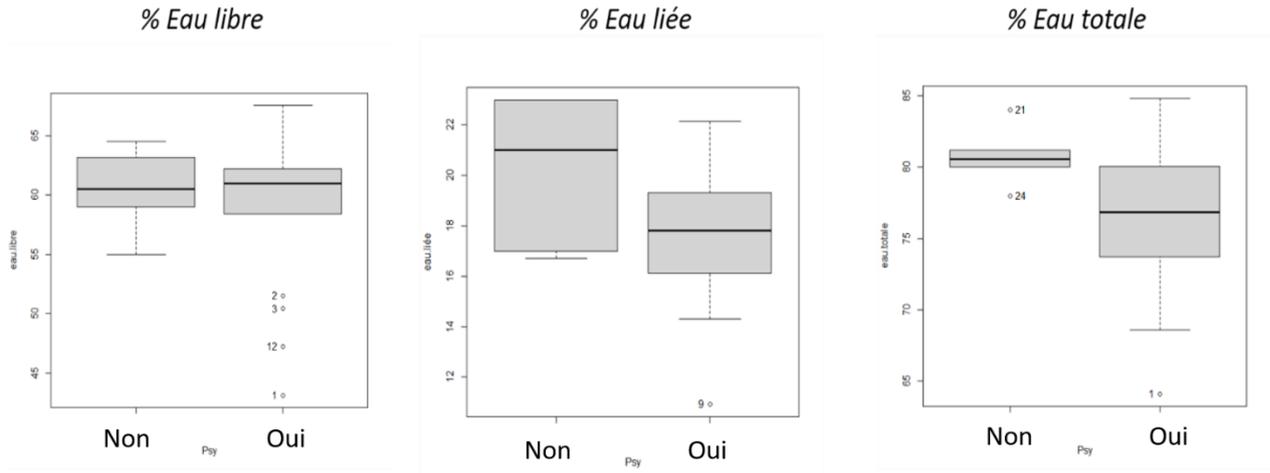
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Eau libre (%)	0.3053	0.004139
Eau liée (%)	0.05119	0.4069
Eau totale (%)	0.3235	0.0964

Annexe 21: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction de la prise d'anticoagulants



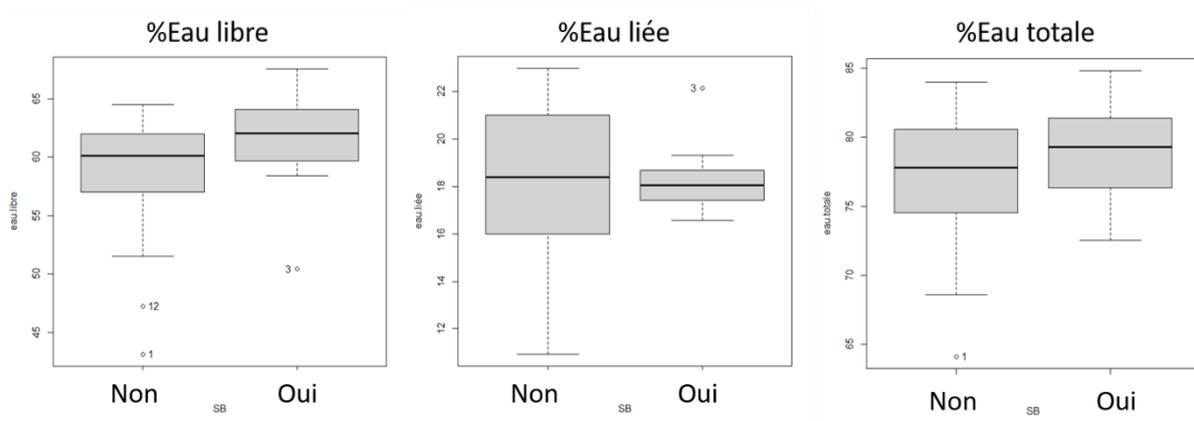
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Eau libre (%)	0.7875	0.004139
Eau liée (%)	0.3267	0.4069
Eau totale (%)	0.7415	0.0964

Annexe 22: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction des traitements des maladies cardiovasculaires



	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Eau libre (%)	0.1611	0.004139
Eau liée (%)	0.829	0.4069
Eau totale (%)	0.06314	0.0964

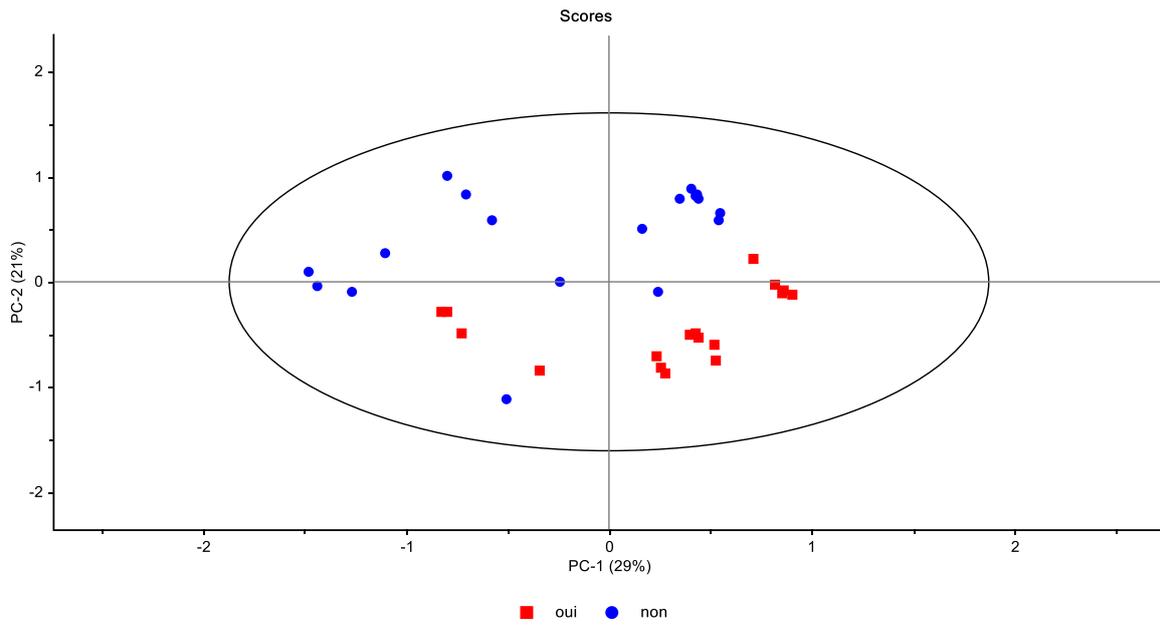
Annexe 23: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction de la prise de psychotropes



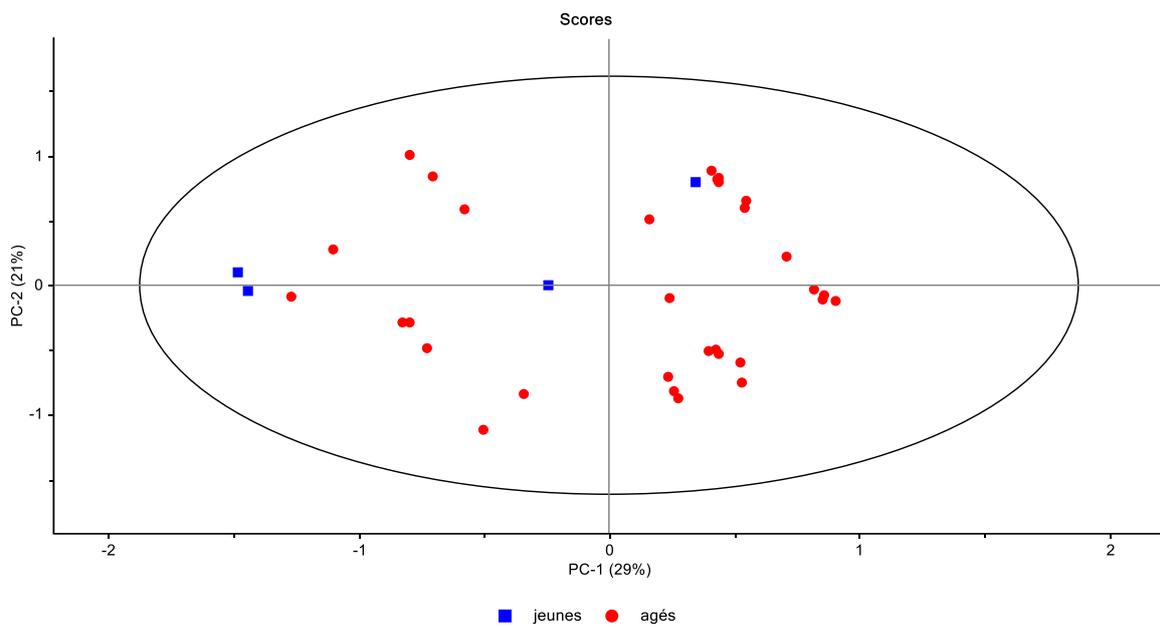
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Eau libre (%)	0.6918	0.004139
Eau liée (%)	0.03956	0.4069
Eau totale (%)	0.3836	0.0964

Annexe 24: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des marqueurs thermiques en fonction de la sécheresse buccale

Annexes

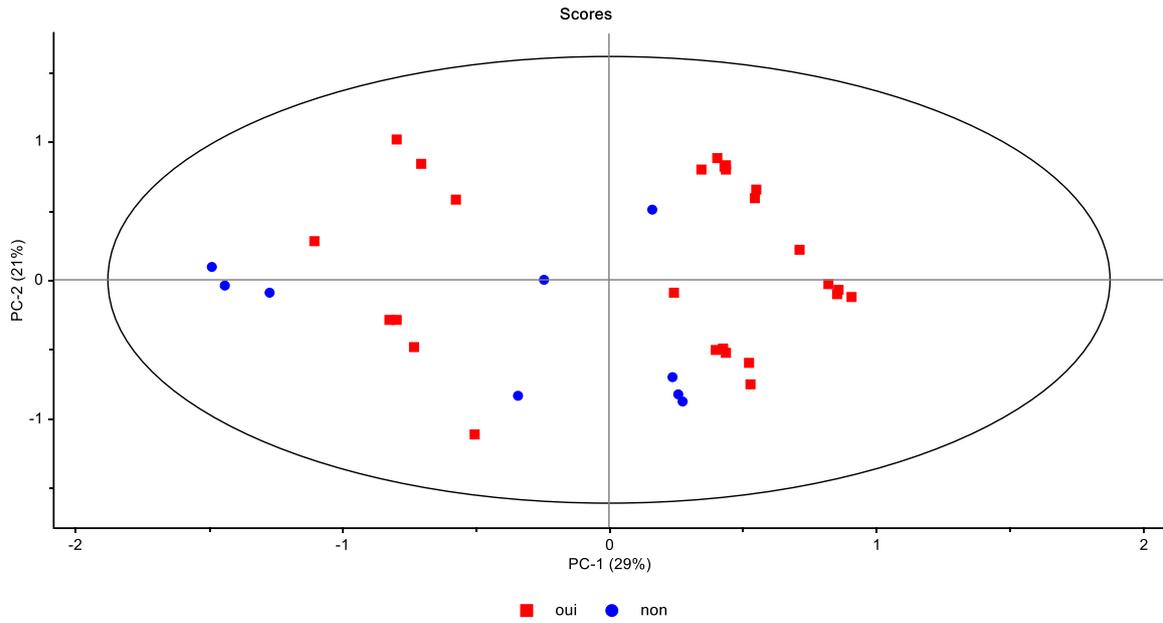


Annexe 25: Projection des profils IRTF des couches lamina propria sur PC1 et PC2 regroupement suivant le diabète (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})

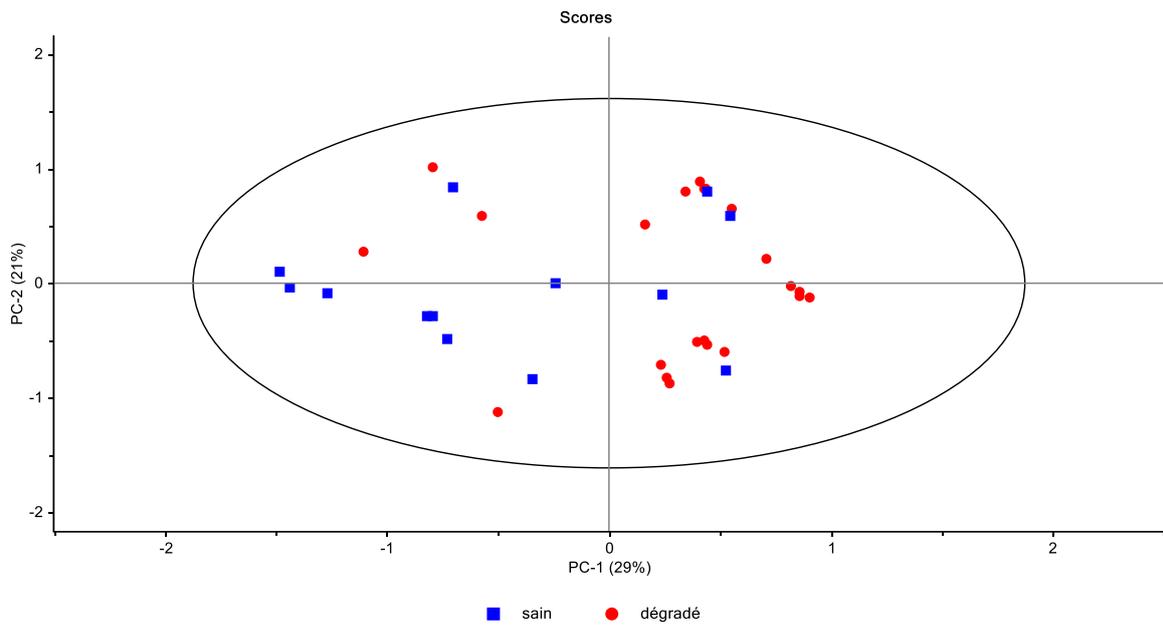


Annexe 26: Projection des profils IRTF des couches lamina propria sur PC1 et PC2 regroupement suivant la classe d'âge (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})

Annexes



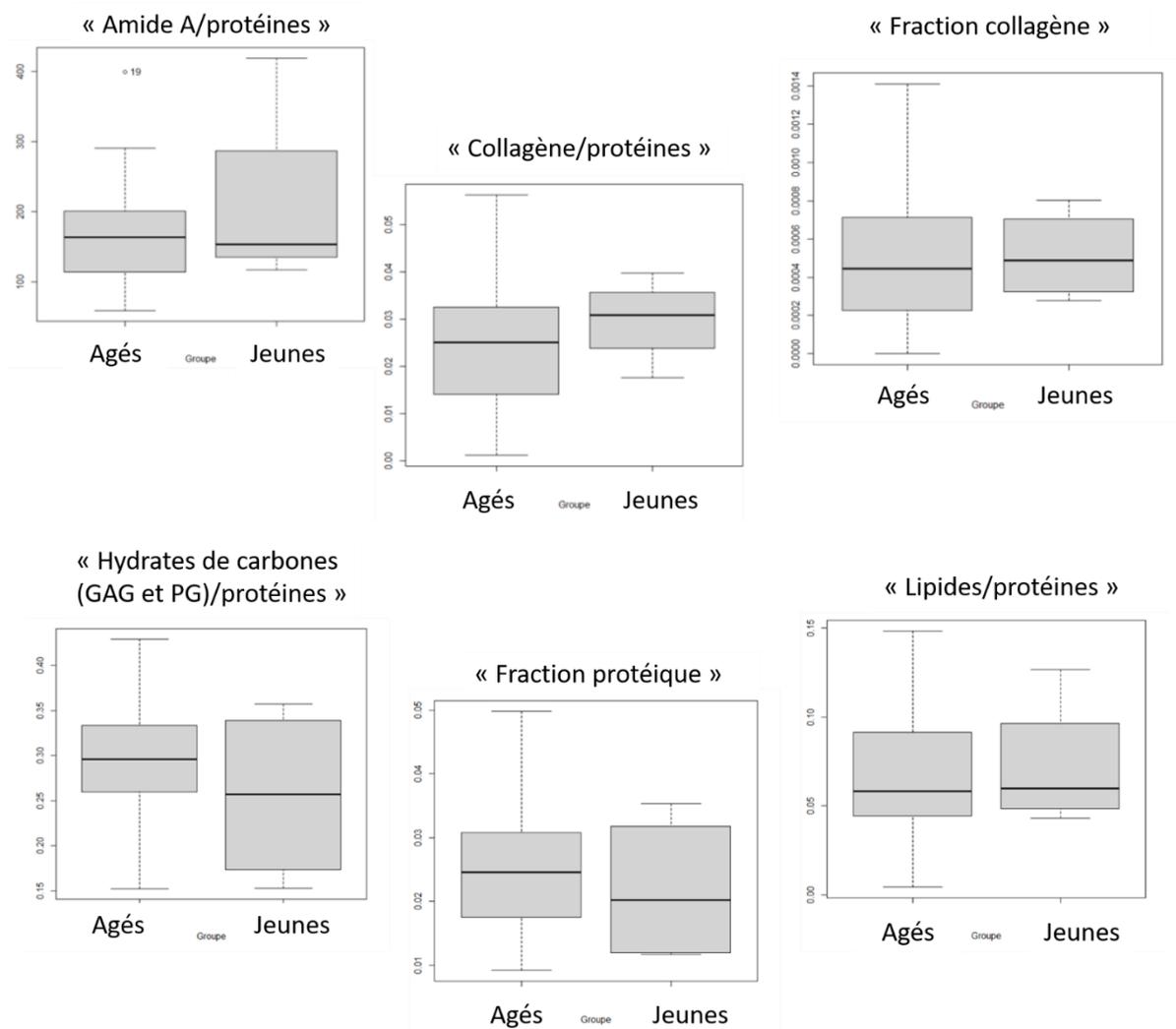
Annexe 27: Projection des profils IRTF des couches lamina propria sur PC1 et PC2 regroupement suivant les maladies cardiovasculaires (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})



Annexe 28: Projection des profils IRTF des couches lamina propria sur PC1 et PC2 regroupement suivant le score OHAT (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})

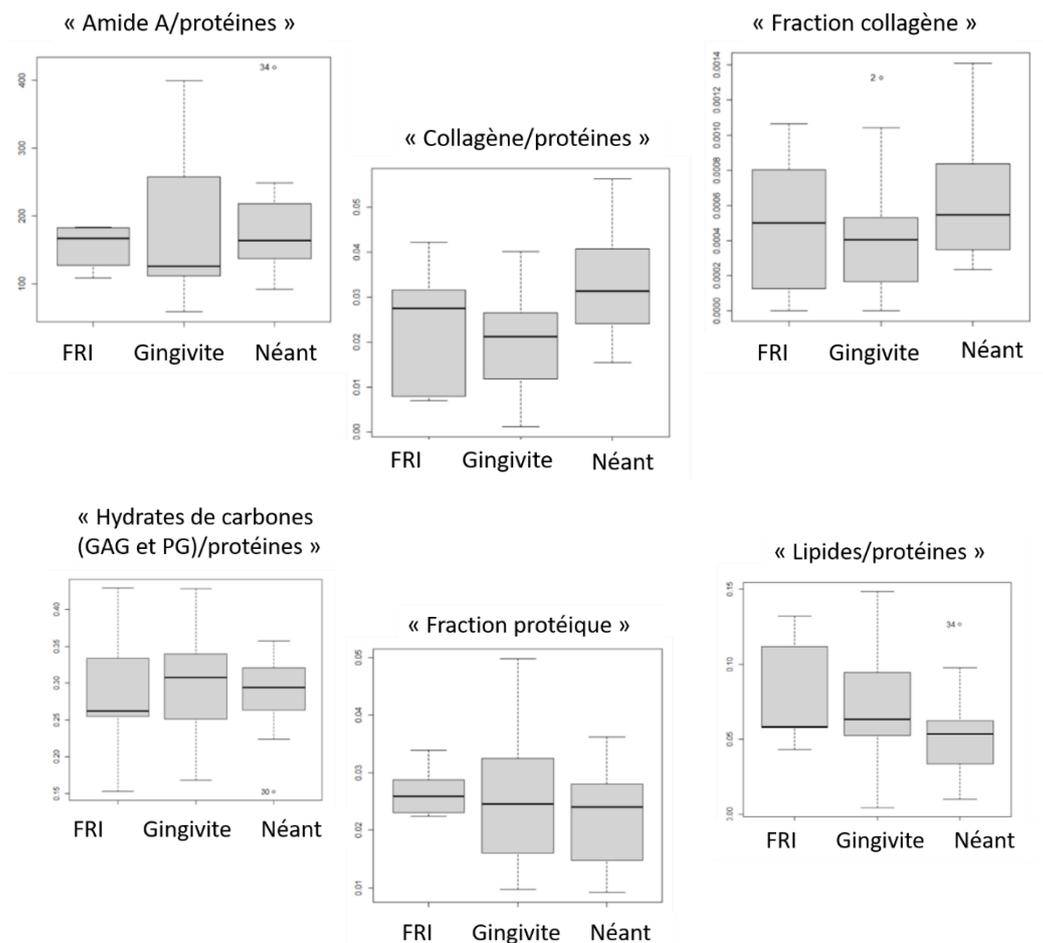
	Lipides/protéines	Collagène/protéines	Fraction collagène	Hydrates de carbones /protéines	Fraction protéique	Amide A/protéines
Minimum	0.0044	0.0011	0	0.15	0.009	58
1^{er} quartile	0.044	0.0160	0.00023	0.25	0.169	118
Médiane	0.058	0.0250	0.00044	0.29	0.024	163
Moyenne	0.065	0.025	0.00050	0.29	0.024	175
3^{ème} quartile	0.091	0.032	0.00071	0.33	0.030	200
Maximum	0.148	0.056	0.00141	0.42	0.049	419

Annexe 29: Distribution des marqueurs vibrationnels de la lamina propria



	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.9028	0.1363
collagène/protéines	0.2869	0.752
Fraction collagène	0.4279	0.07811
Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines	0.2043	0.3863
Fraction protéique	0.4357	0.2451
Amide A/protéines	0.02967	0.002204

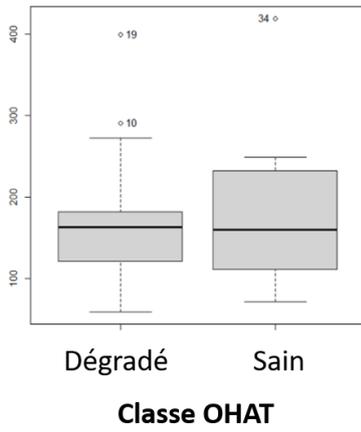
Annexe 30: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la lamina propria en fonction de la classe d'âge



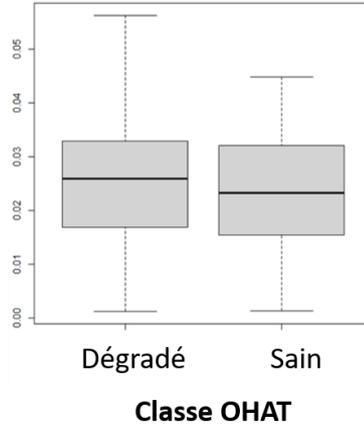
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.586	0.1363
collagène/protéines	0.8253	0.752
Fraction collagène	0.9107	0.07811
Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines	0.3937	0.3863
Fraction protéique	0.03909	0.2451
Amide A/protéines	0.1269	0.002204

Annexe 31: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la lamina propria en fonction des signes cliniques locaux

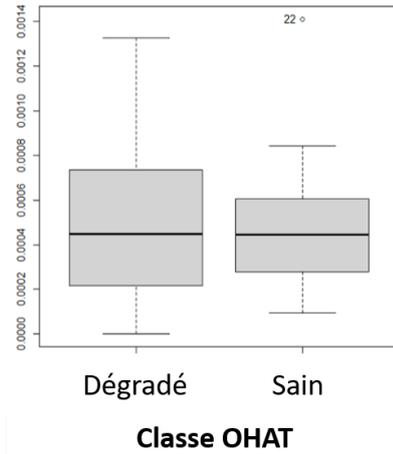
« Amide A/protéines »



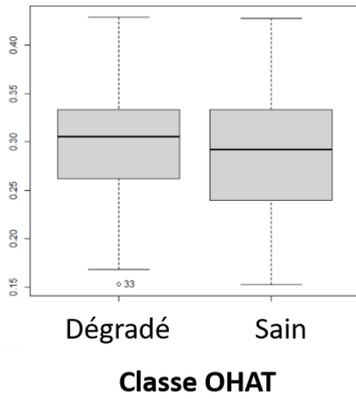
« Collagène/protéines »



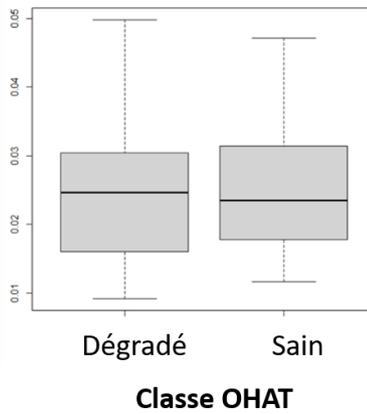
« Fraction collagène »



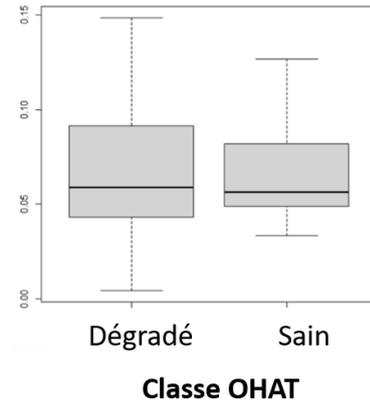
« Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines »



« Fraction protéique »

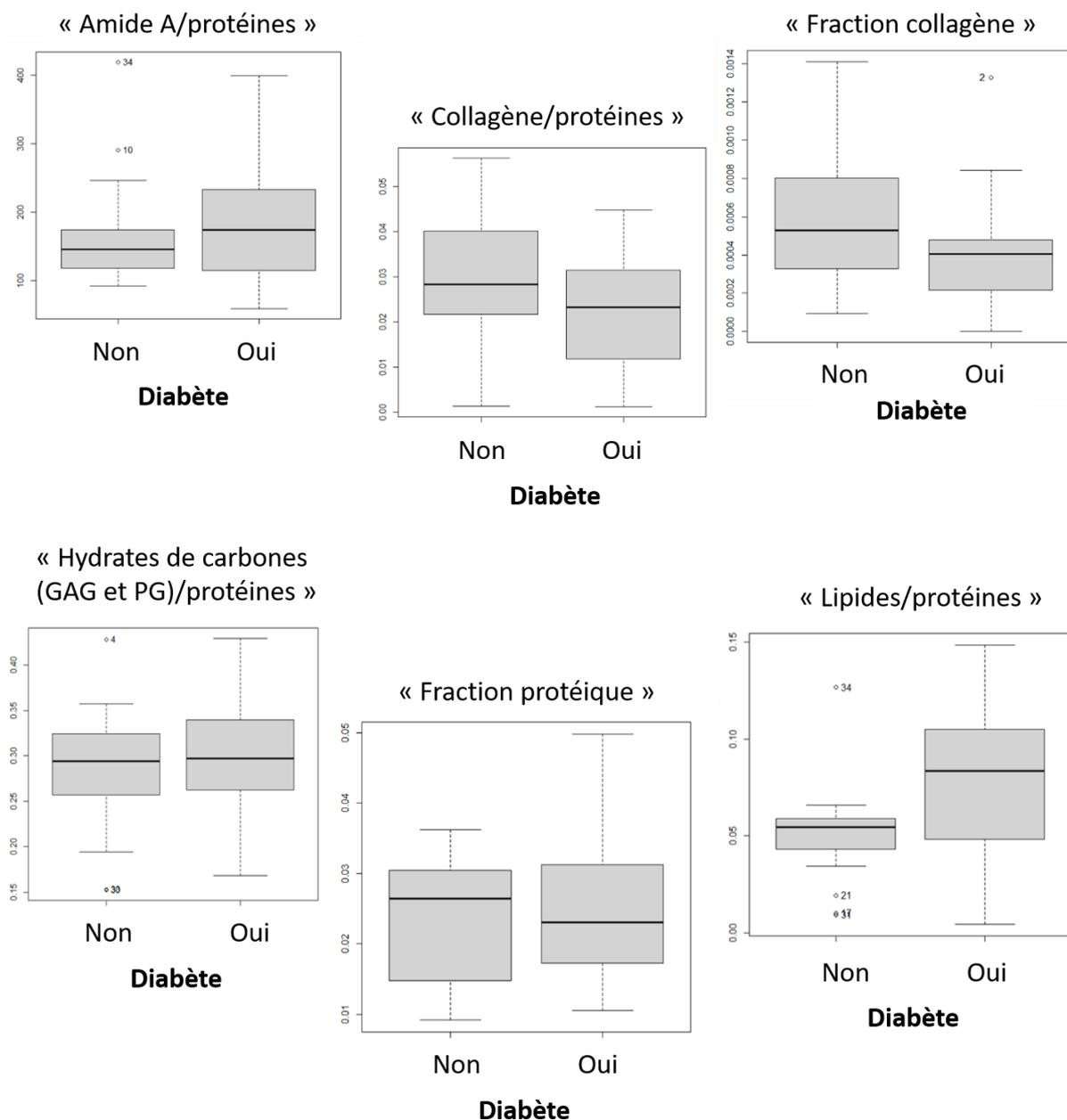


« Lipides/protéines »



	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.1932	0.1363
collagène/protéines	0.8847	0.752
Fraction collagène	0.6531	0.07811
Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines	0.9474	0.3863
Fraction protéique	0.7629	0.2451
Amide A/protéines	0.5778	0.002204

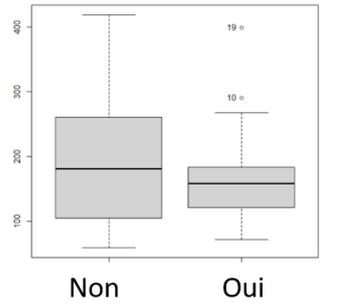
Annexe 32: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la lamina propria en fonction du score OHAT



	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.02502	0.1363
collagène/protéines	0.9858	0.752
Fraction collagène	0.7574	0.07811
Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines	0.8113	0.3863
Fraction protéique	0.7961	0.2451
Amide A/protéines	0.8559	0.002204

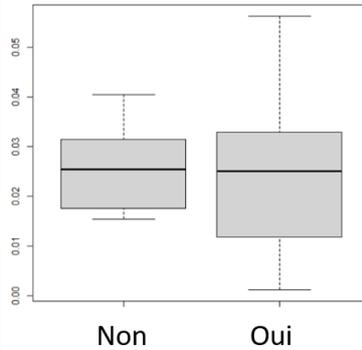
Annexe 33: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la lamina propria en fonction du diabète

« Amide A/protéines »



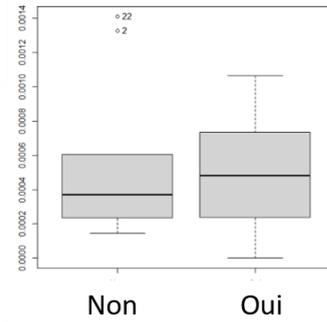
Maladies cardiovasculaires

« Collagène/protéines »



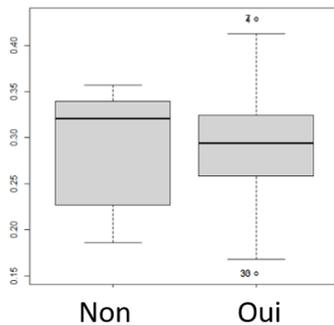
Maladies cardiovasculaires

« Fraction collagène »



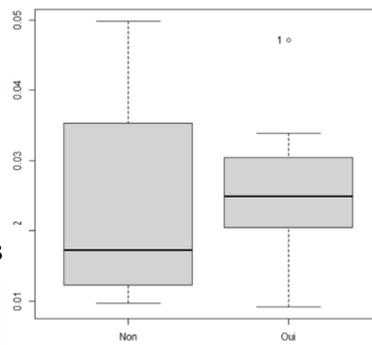
Maladies cardiovasculaires

« Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines »



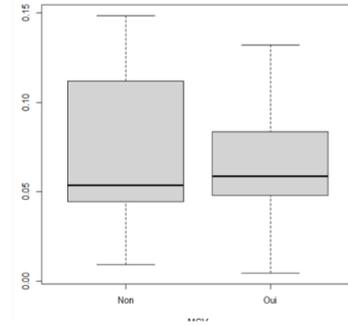
Maladies cardiovasculaires

« Fraction protéique »



Maladies cardiovasculaires

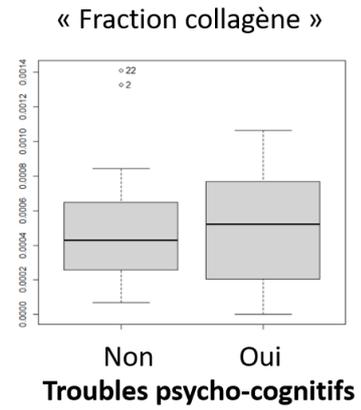
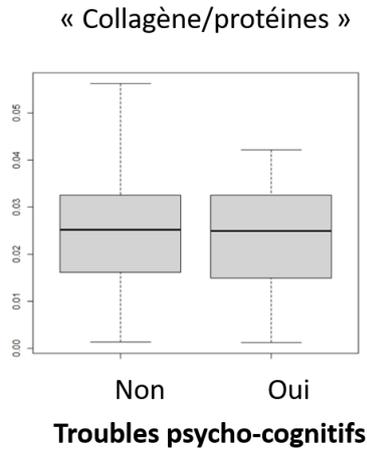
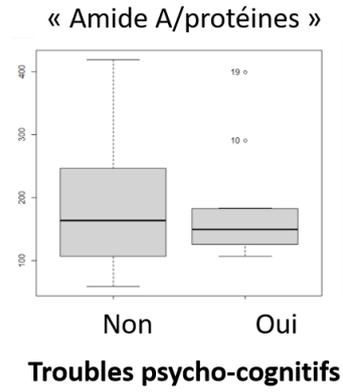
« Lipides/protéines »



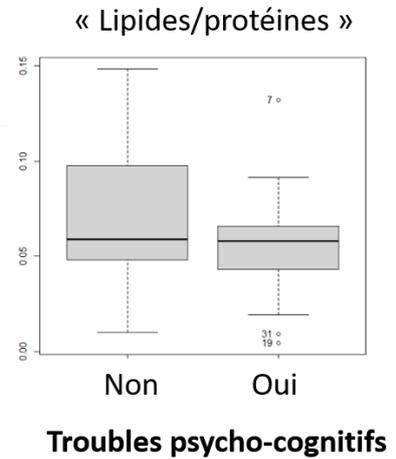
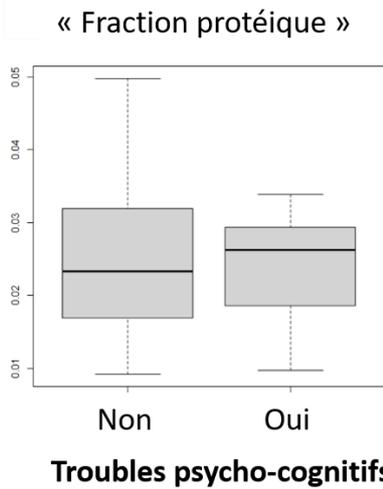
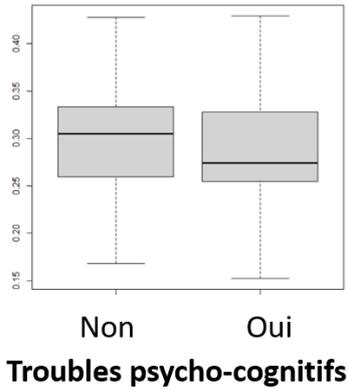
Maladies cardiovasculaires

	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.1262	0.1363
collagène/protéines	0.243	0.752
Fraction collagène	0.1297	0.07811
Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines	0.7441	0.3863
Fraction protéique	0.03096	0.2451
Amide A/protéines	0.05062	0.002204

Annexe 34: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la lamina propria en fonction des maladies cardiovasculaires



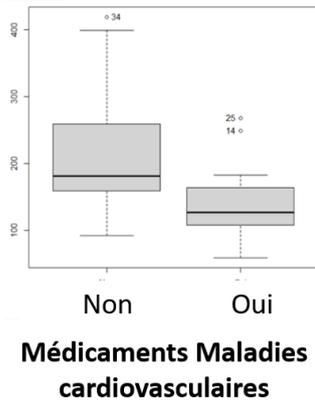
« Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines »



	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.1618	0.1363
collagène/protéines	0.8121	0.752
Fraction collagène	0.8788	0.07811
Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines	0.9593	0.3863
Fraction protéique	0.1523	0.2451
Amide A/protéines	0.363	0.002204

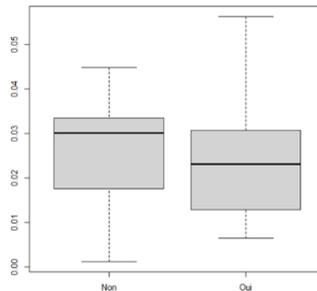
Annexe 35: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la lamina propria en fonction des troubles psycho-cognitifs

« Amide A/protéines »



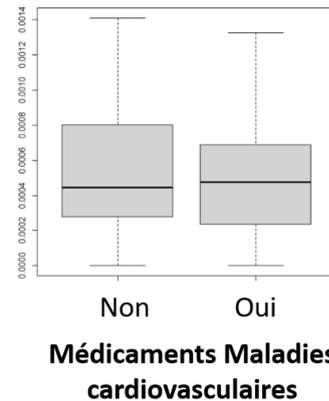
Médicaments Maladies
cardiovasculaires

« Collagène/protéines »



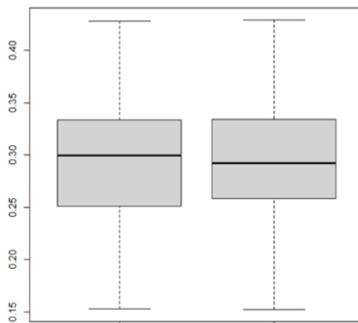
Médicaments Maladies
cardiovasculaires

« Fraction collagène »



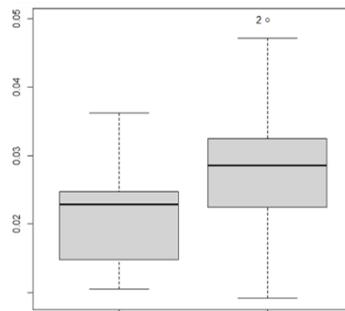
Médicaments Maladies
cardiovasculaires

« Hydrates de carbones
(GAG et PG)/protéines »



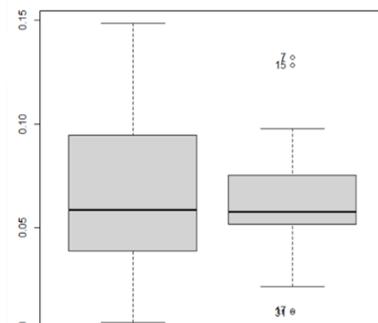
Médicaments Maladies
cardiovasculaires

« Fraction protéique »



Médicaments Maladies
cardiovasculaires

« Lipides/protéines »

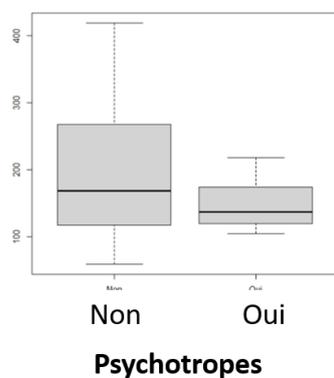


Médicaments Maladies
cardiovasculaires

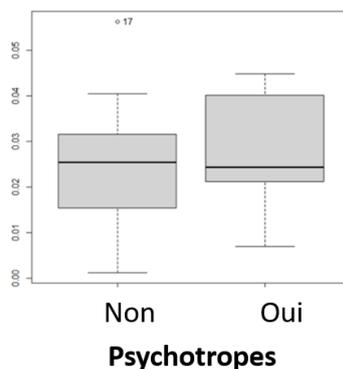
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.6045	0.1363
collagène/protéines	0.6884	0.752
Fraction collagène	0.9563	0.07811
Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines	0.794	0.3863
Fraction protéique	0.5674	0.2451
Amide A/protéines	0.05195	0.002204

Annexe 36: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la lamina propria en fonction des traitements de maladies cardiovasculaires

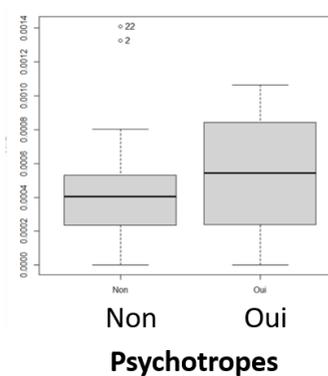
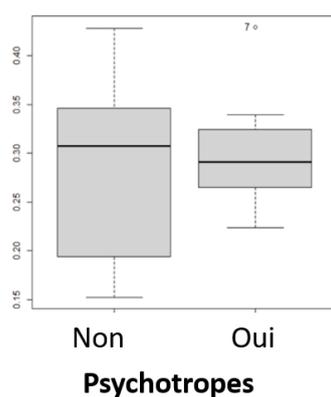
« Amide A/protéines »



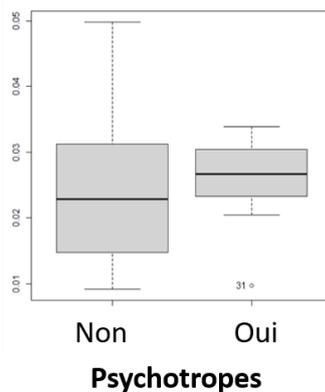
« Collagène/protéines »



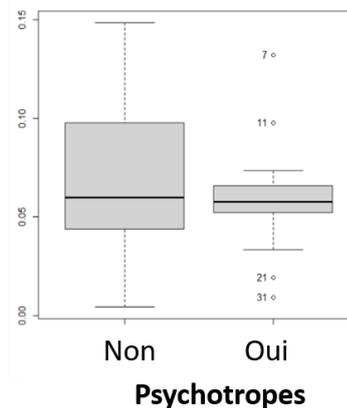
« Fraction collagène »

« Hydrates de carbones
(GAG et PG)/protéines »

« Fraction protéique »

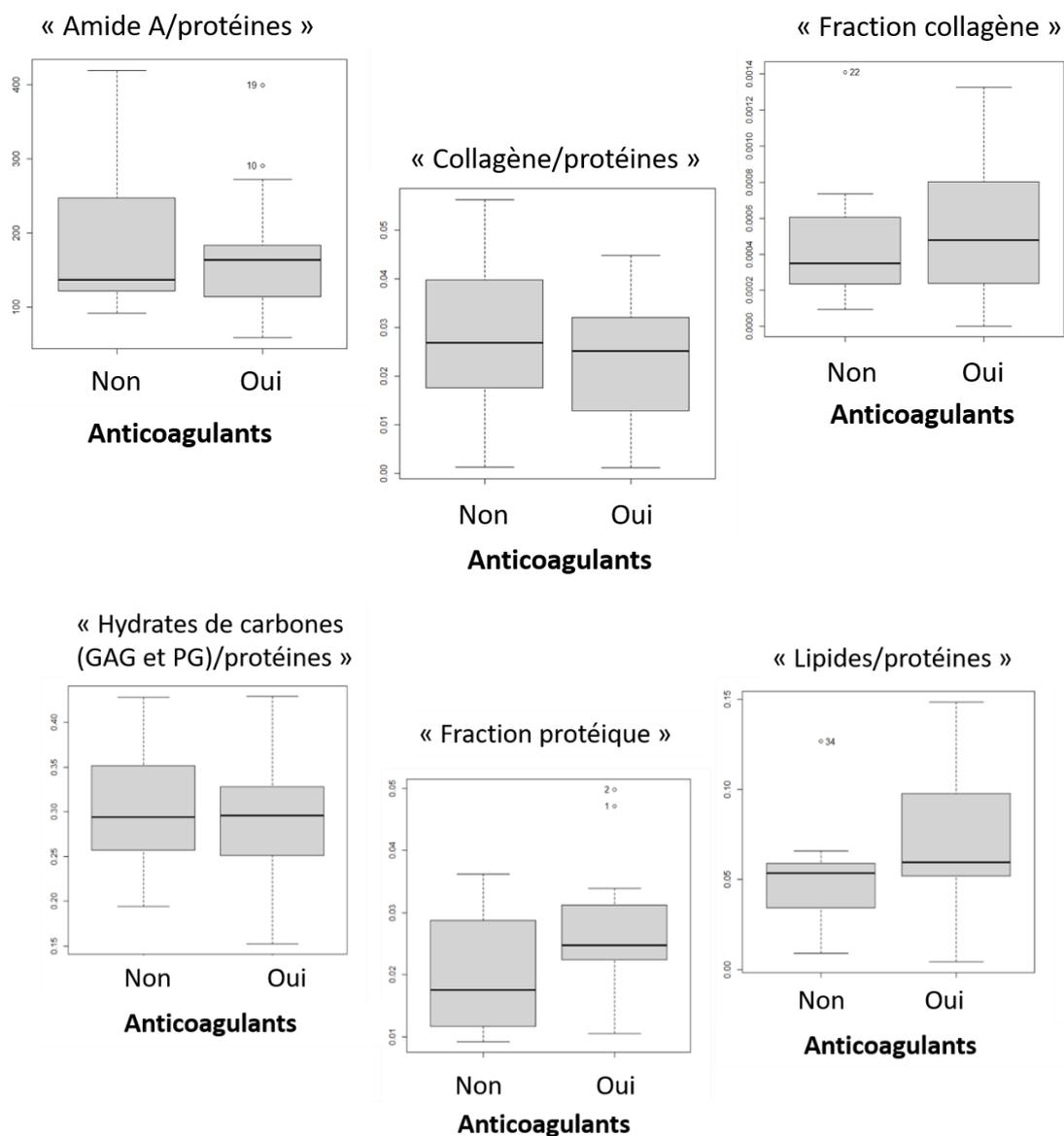


« Lipides/protéines »



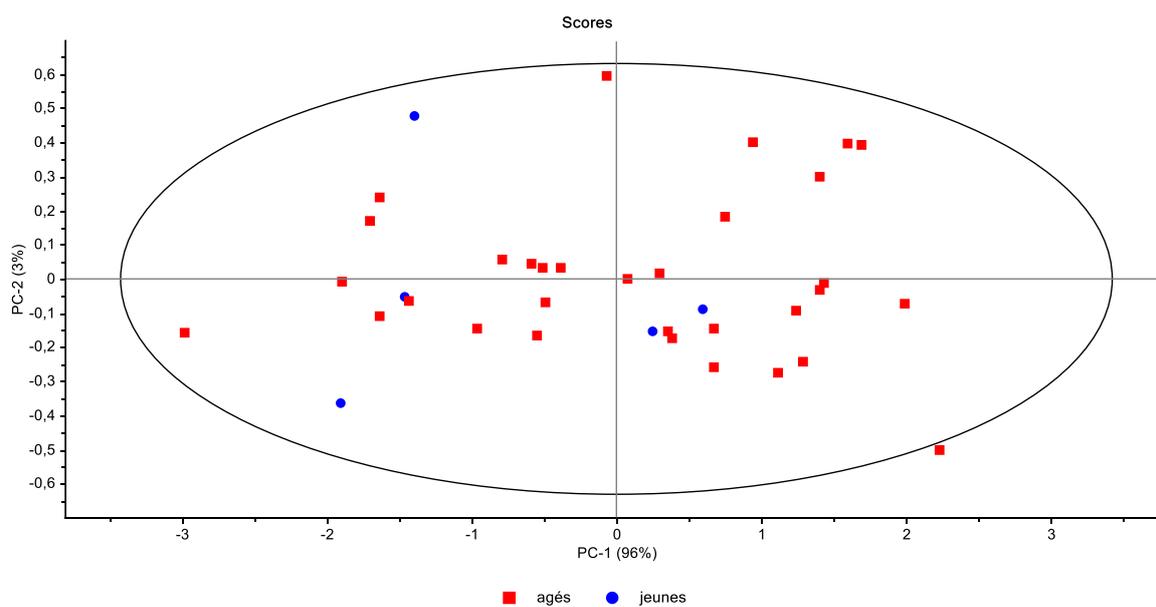
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.1472	0.1363
collagène/protéines	0.8707	0.752
Fraction collagène	0.7149	0.07811
Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines	0.04845	0.3863
Fraction protéique	0.0227	0.2451
Amide A/protéines	0.00217	0.002204

Annexe 37: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la lamina propria en fonction des psychotropes

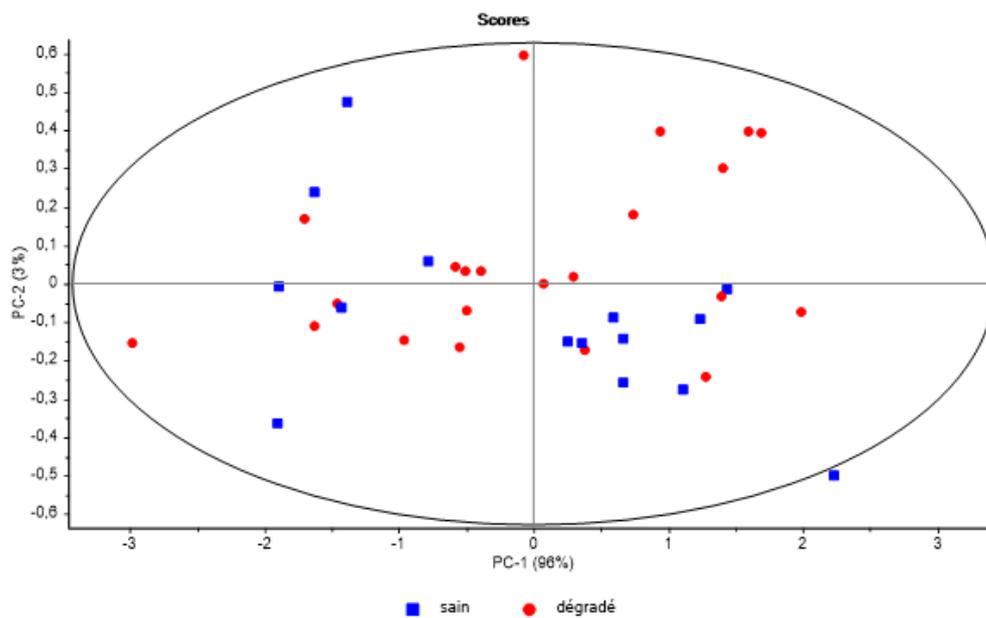


	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.5346	0.1363
collagène/protéines	0.5642	0.752
Fraction collagène	0.9688	0.07811
Hydrates de carbones (GAG et PG)/protéines	0.8562	0.3863
Fraction protéique	0.2826	0.2451
Amide A/protéines	0.1265	0.002204

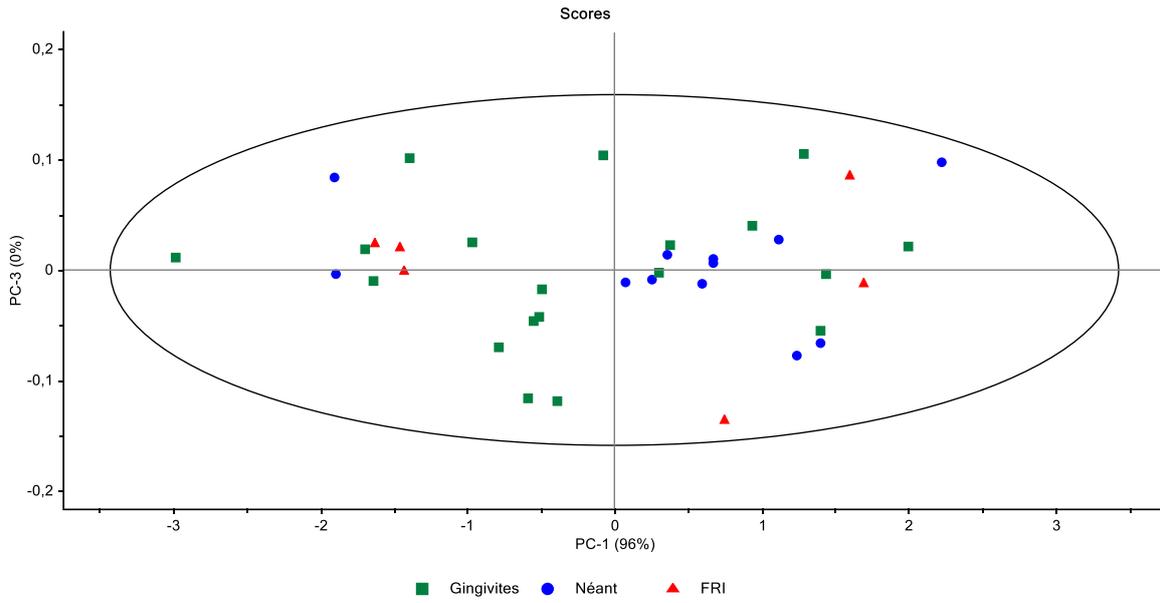
Annexe 38: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la lamina propria en fonction des anticoagulants



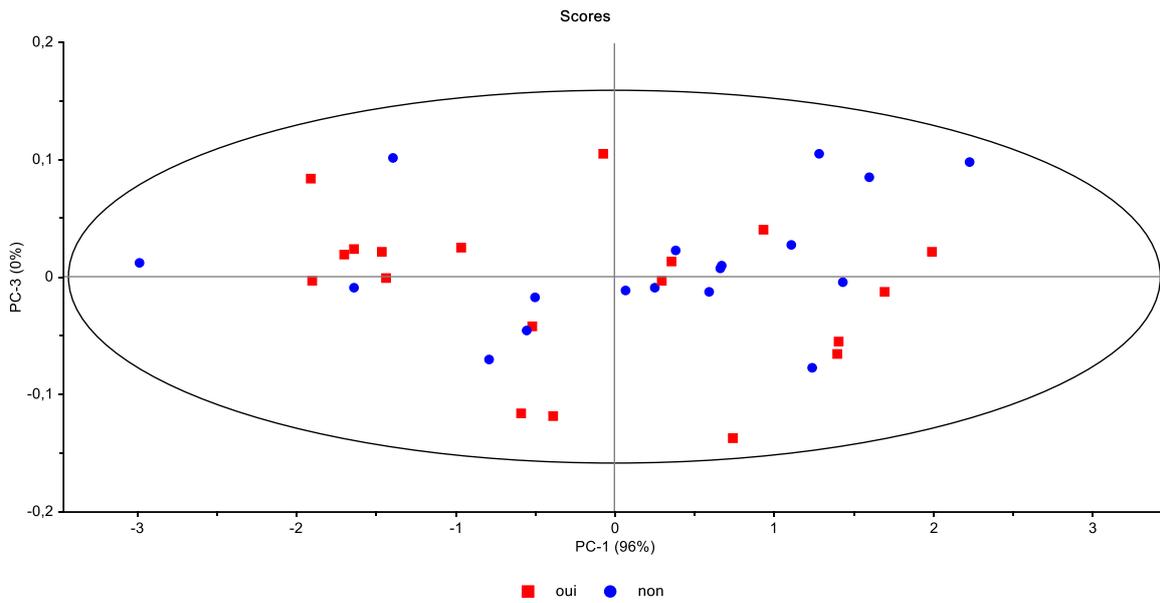
Annexe 39: Projection des profils IRTF des couches épithéliales sur PC1 et PC2 regroupement suivant la classe d'âge (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})



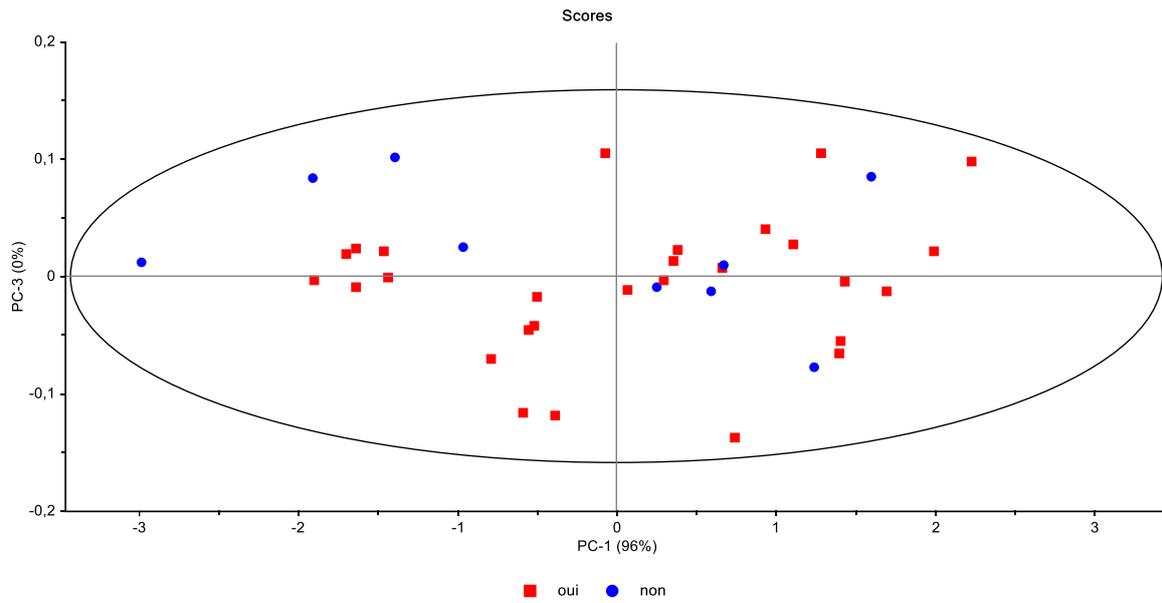
Annexe 40: Projection des profils IRTF des couches épithéliales sur PC1 et PC2 regroupement suivant le score OHAT (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})



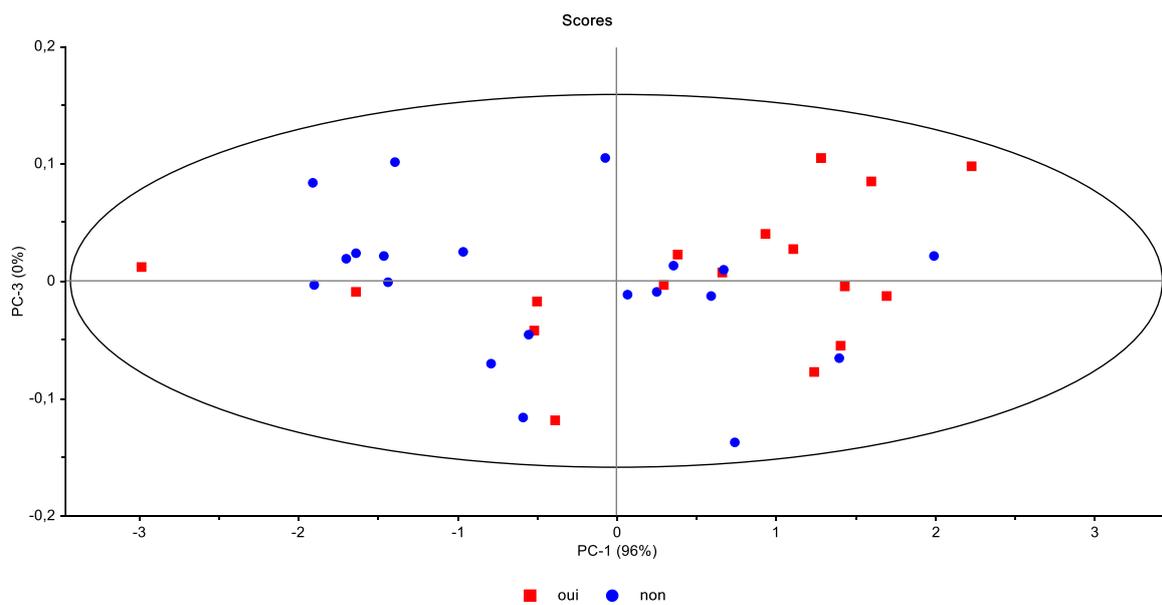
Annexe 41: Projection des profils IRTF des couches épithéliales sur PC1 et PC3 regroupement suivant les signes cliniques locaux (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})



Annexe 42: Projection des profils IRTF des couches épithéliales sur PC1 et PC3 regroupement suivant les troubles psycho-cognitifs (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})



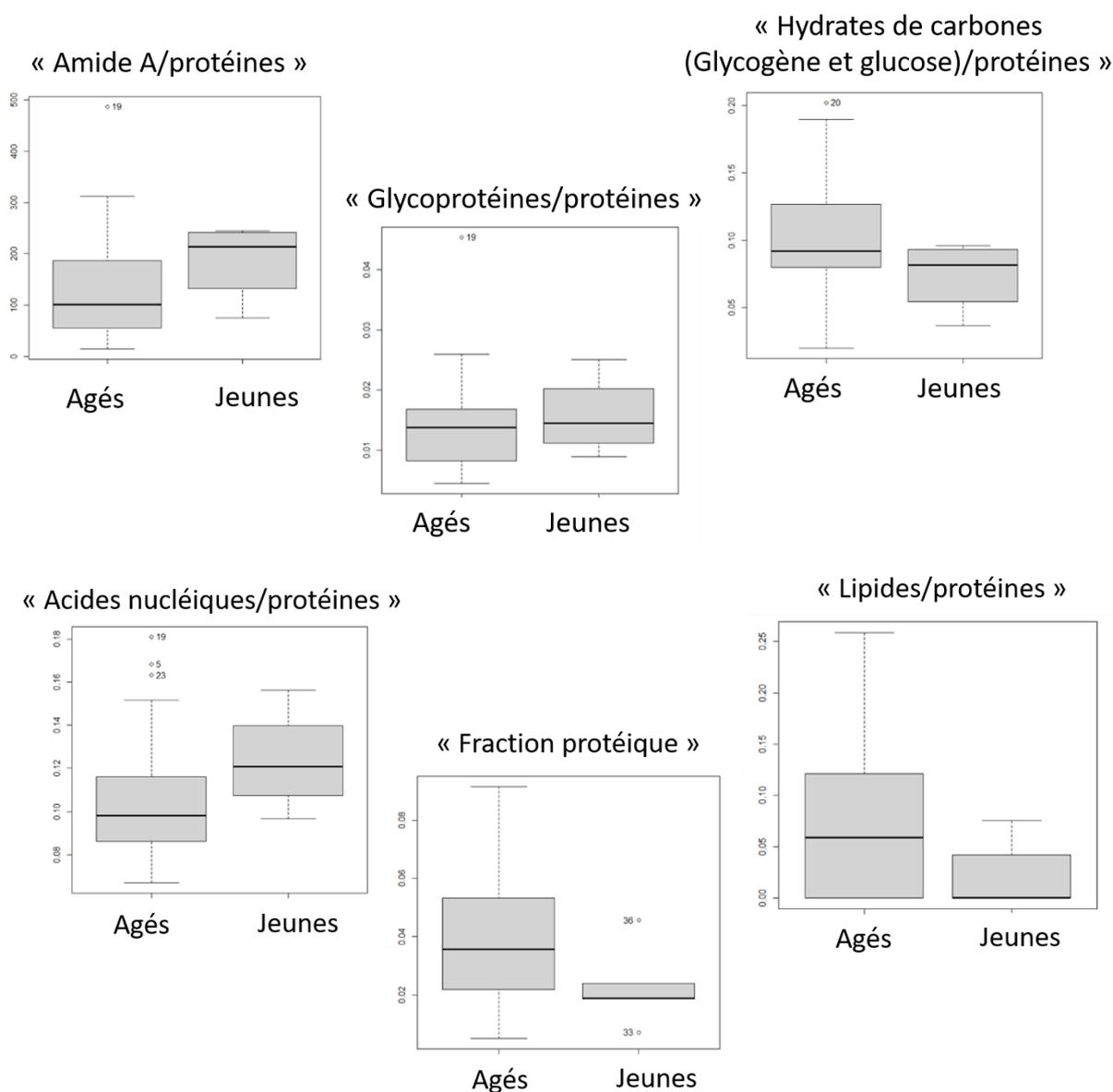
Annexe 43: Projection des profils IRTF des couches épithéliales sur PC1 et PC3 regroupement suivant les maladies cardiovasculaires (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})



Annexe 44: Projection des profils IRTF des couches épithéliales sur PC1 et PC3 regroupement suivant (dans la zone 1490-1000 cm^{-1})

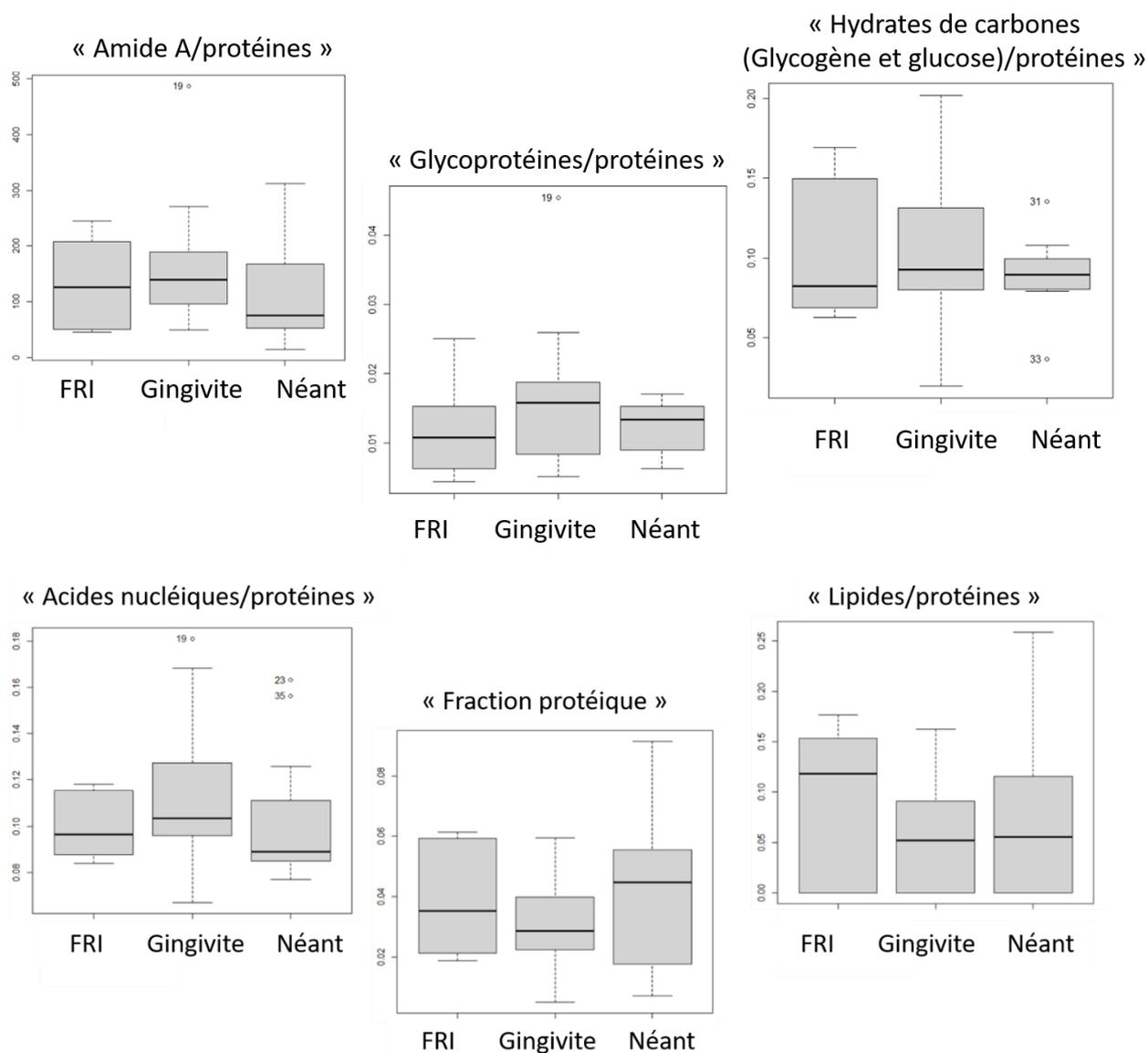
	Lipides /protéines	Acides nucléiques /protéines	Glycoprotéines /protéines	Glycose et glycogène /protéines	Fraction protéique	Amide A/protéines
Minimum	0	0.066	0.004	0.019	0.004	13
1^{er} quartile	0	0.087	0.008	0.079	0.02	60
Médiane	0.05	0.10	0.137	0.09	0.03	106
Moyenne	0.06	0.107	0.141	0.101	0.04	139
3^{ème} quartile	0.11	0.12	0.016	0.115	0.05	191
Maximum	0.25	0.181	0.045	0.202	0.09	487

Annexe 45: Distribution des marqueurs vibrationnels de l'épithélium



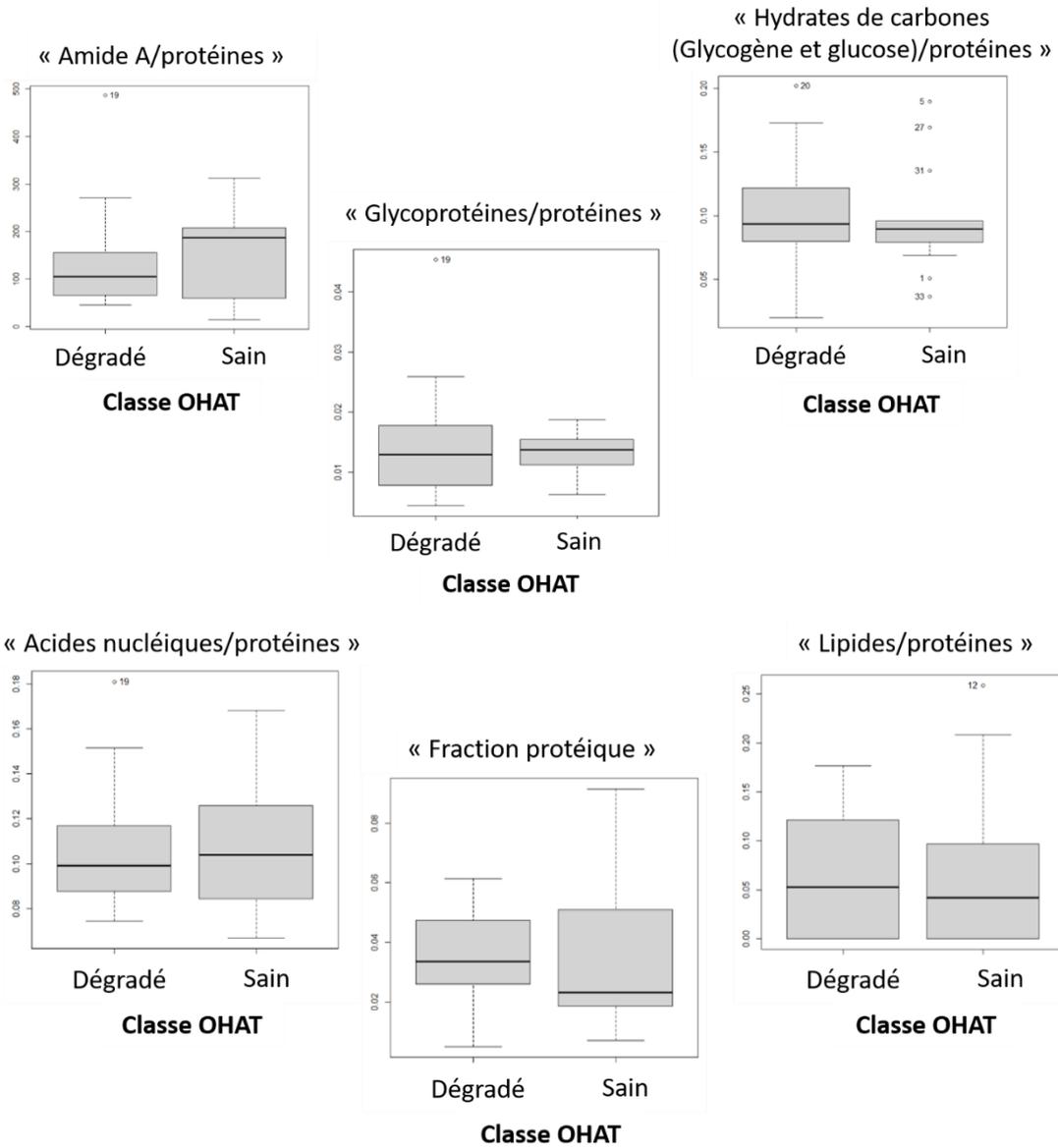
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.09728	0.0008467
Acides nucléiques/protéines	0.5657	0.004053
Glycoprotéines (mucines) /protéines	0.7614	0.000107
Hydrates de carbones (glycogène et glucose) /protéines	0.3452	0.04221
Fraction protéique	0.1856	0.1284
Amide A/protéines	0.4908	0.001559

Annexe 46: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de l'épithélium en fonction de la classe d'âge



	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.2167	0.0008467
Acides nucléiques/protéines	0.3156	0.004053
Glycoprotéines (mucines) /protéines	0.3448	0.000107
Hydrates de carbones (glycogène et glucose) /protéines	0.08128	0.04221
Fraction protéique	0.1413	0.1284
Amide A/protéines	0.8623	0.001559

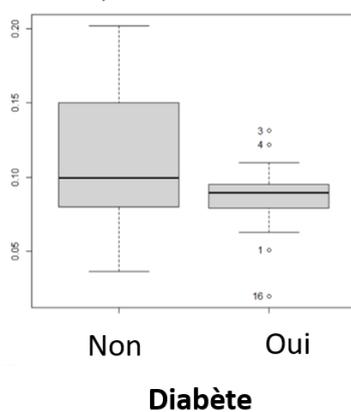
Annexe 47: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de l'épithélium en fonction des signes cliniques locaux



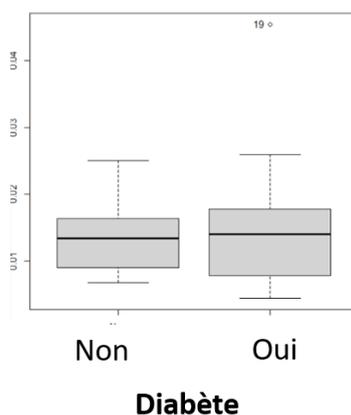
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.3323	0.0008467
Acides nucléiques/protéines	0.1065	0.004053
Glycoprotéines (mucines) /protéines	0.03037	0.000107
Hydrates de carbones (glycogène et glucose) /protéines	0.8646	0.04221
Fraction protéique	0.03892	0.1284
Amide A/protéines	0.4873	0.001559

Annexe 48: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de l'épithélium en fonction du score OHAT

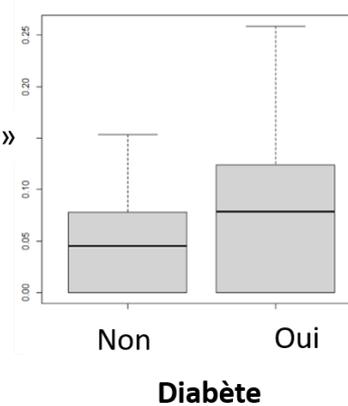
« Hydrates de carbones
(Glycogène et glucose)/protéines »



« Glycoprotéines/protéines »

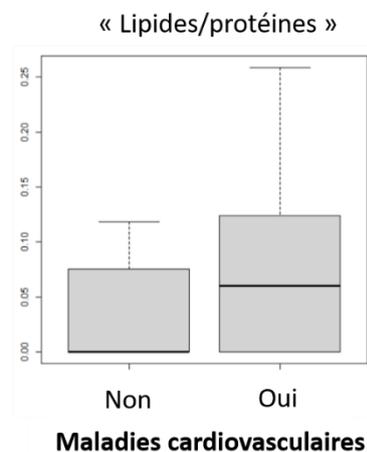
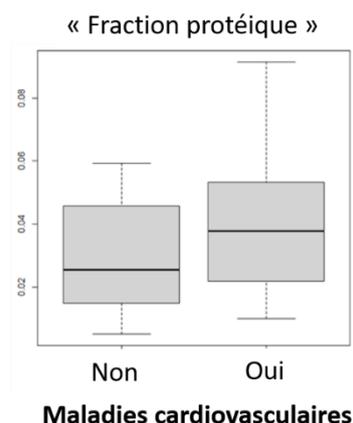
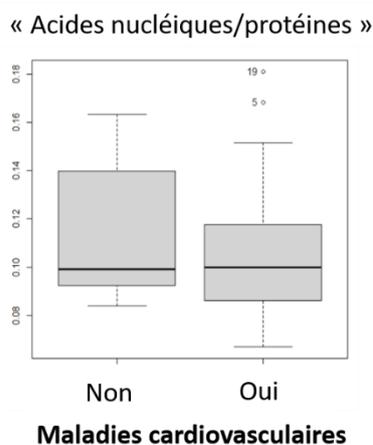
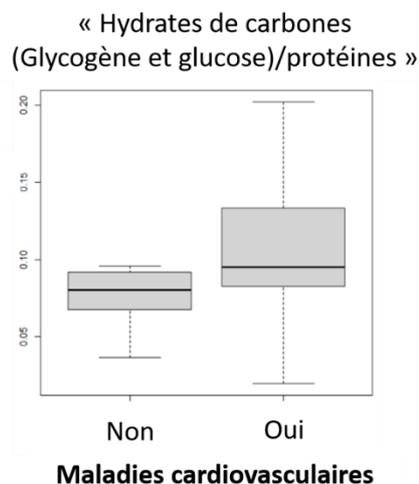
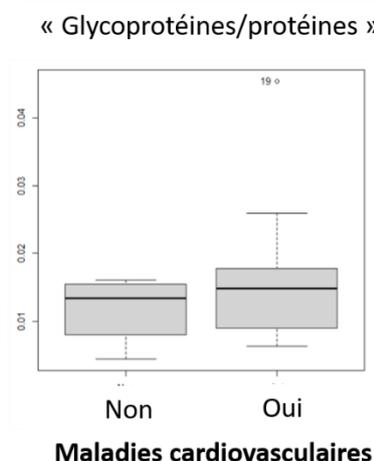
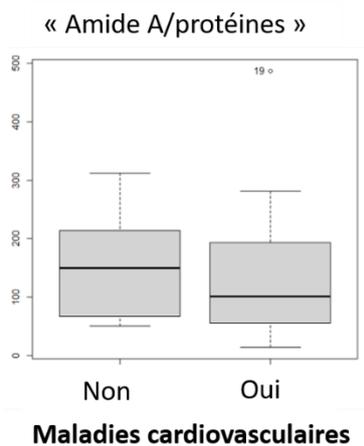


« Lipides/protéines »



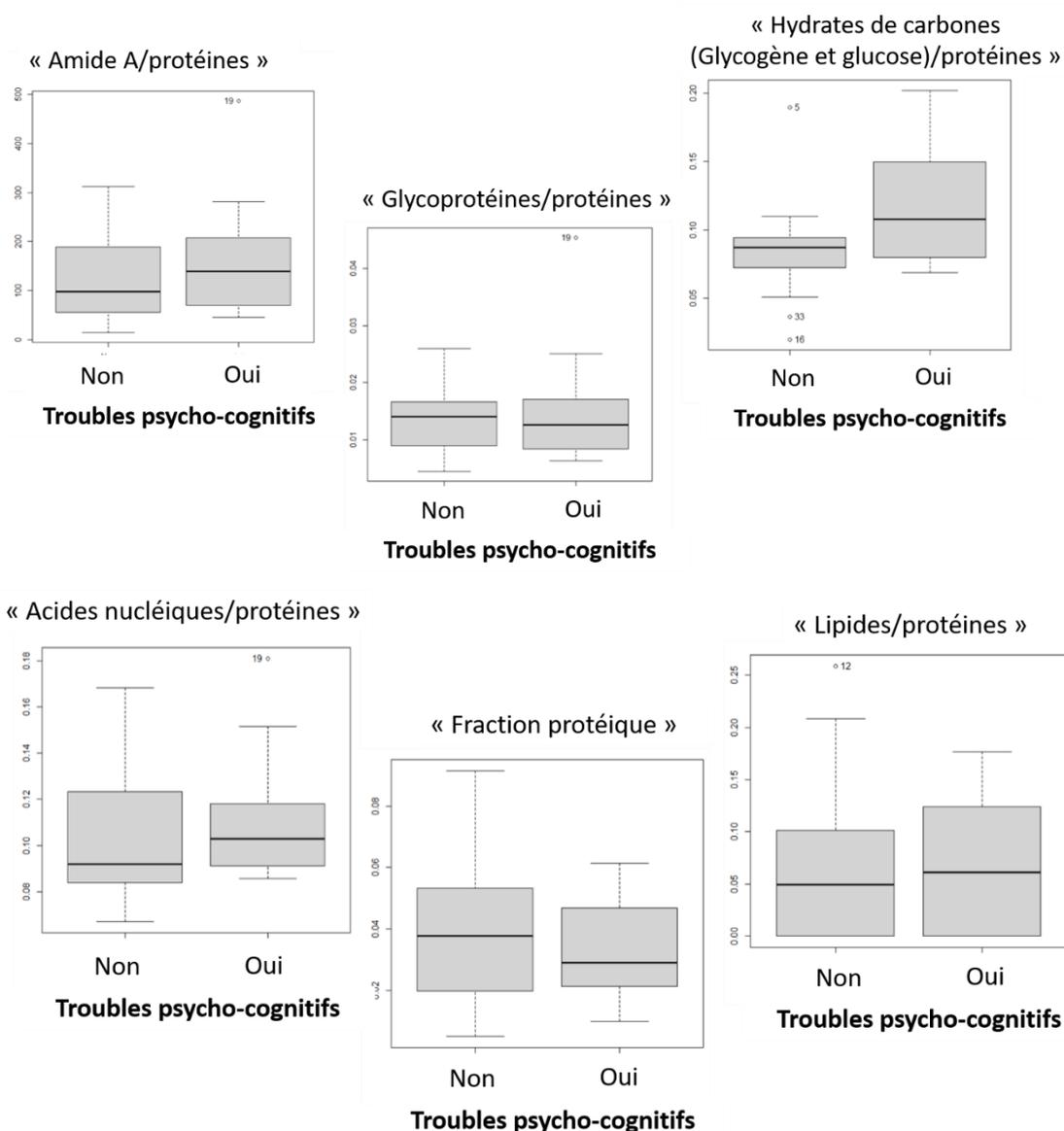
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.1066	0.0008467
Acides nucléiques/protéines	0.5422	0.004053
Glycoprotéines (mucines) /protéines	0.1401	0.000107
Hydrates de carbones (glycogène et glucose) /protéines	0.002361	0.04221
Fraction protéique	0.03754	0.1284
Amide A/protéines	0.8256	0.001559

Annexe 49: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de l'épithélium en fonction du diabète



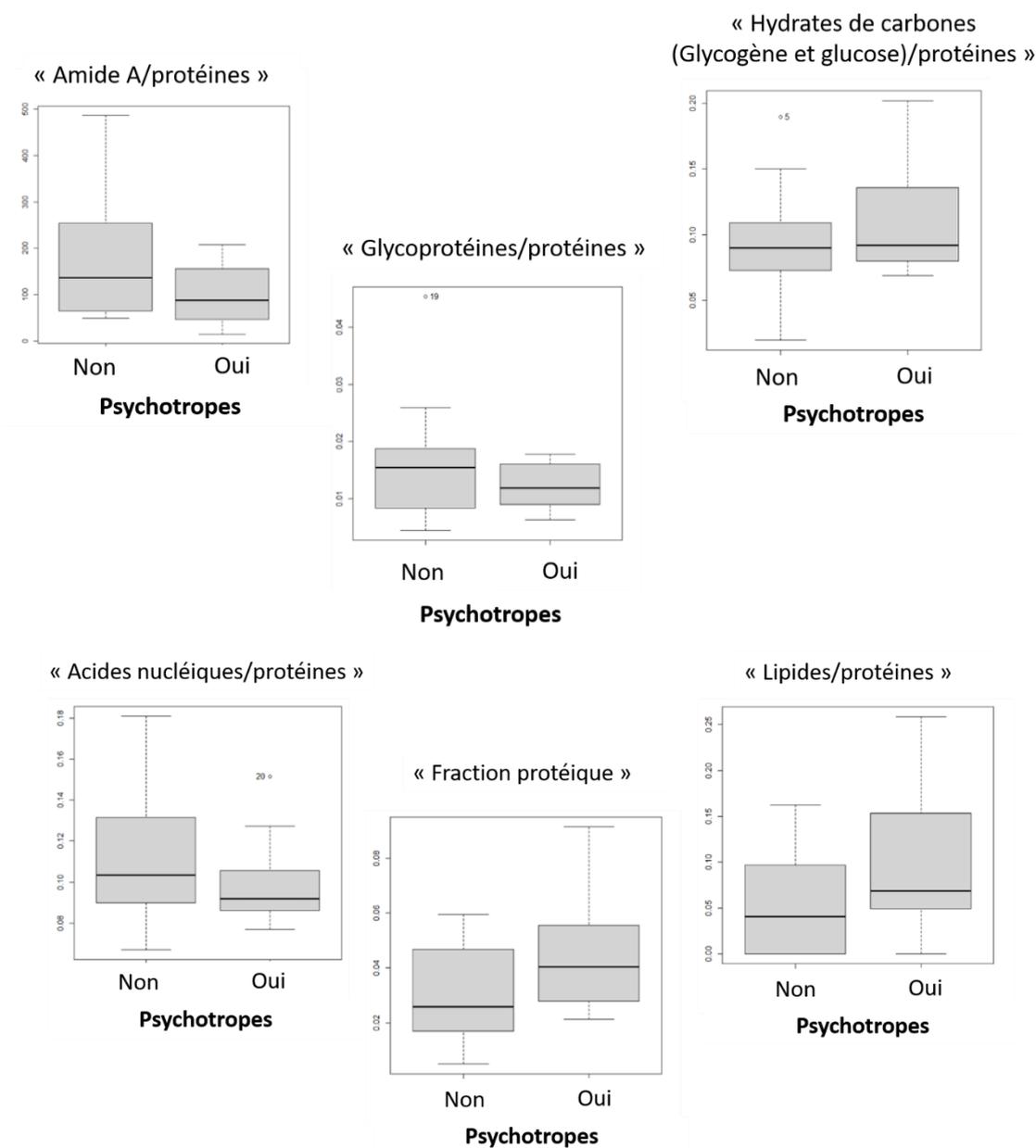
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.2055	0.0008467
Acides nucléiques/protéines	0.5837	0.004053
Glycoprotéines (mucines) /protéines	0.3542	0.000107
Hydrates de carbones (glycogène et glucose) /protéines	0.05858	0.04221
Fraction protéique	0.6484	0.1284
Amide A/protéines	0.639	0.001559

Annexe 50: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de l'épithélium en fonction des maladies cardiovasculaires



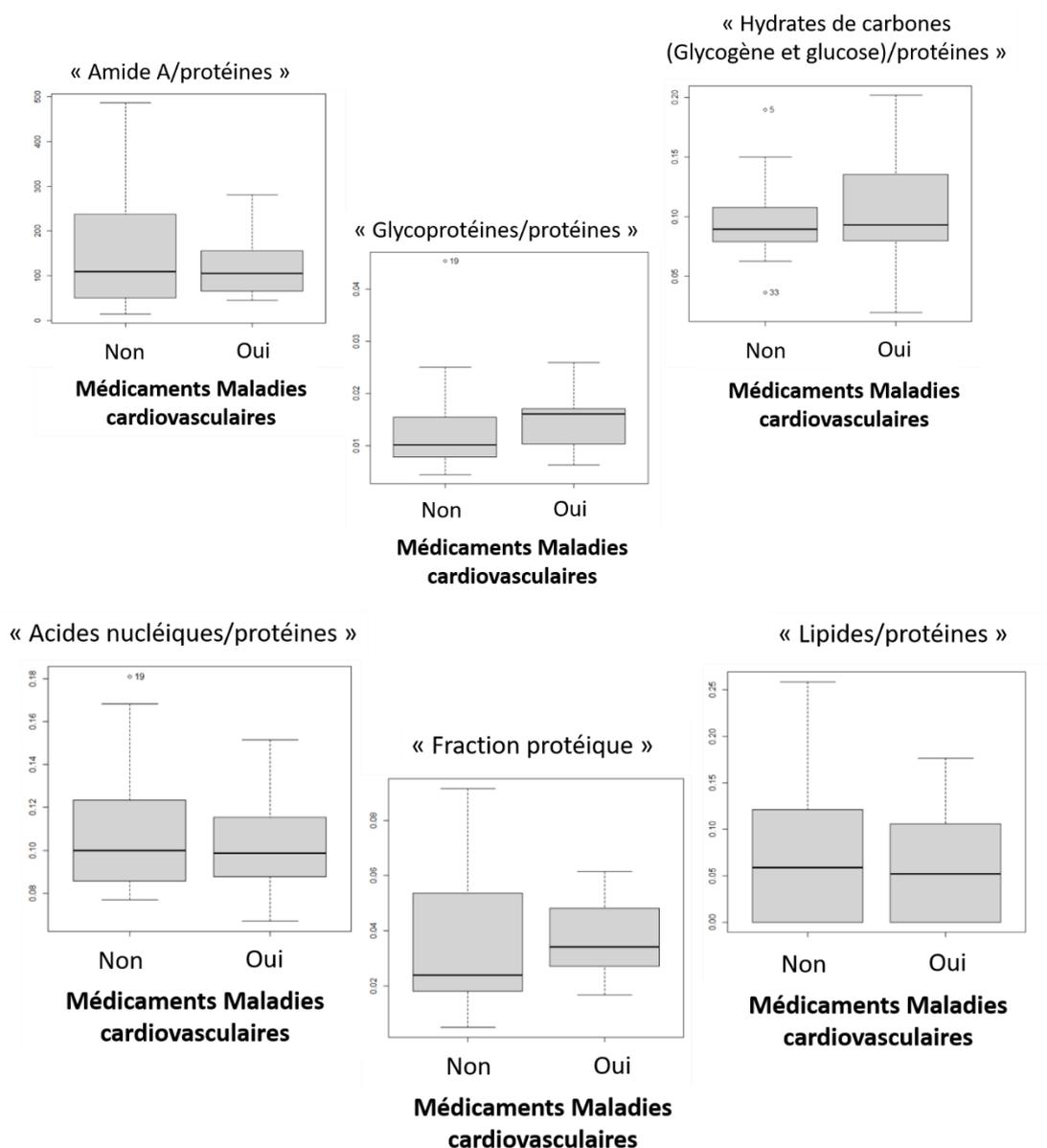
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.9147	0.0008467
Acides nucléiques/protéines	0.1741	0.004053
Glycoprotéines (mucines) /protéines	0.2798	0.000107
Hydrates de carbones (glycogène et glucose) /protéines	0.1854	0.04221
Fraction protéique	0.1131	0.1284
Amide A/protéines	0.5601	0.001559

Annexe 51: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de l'épithélium en fonction troubles psycho-cognitifs



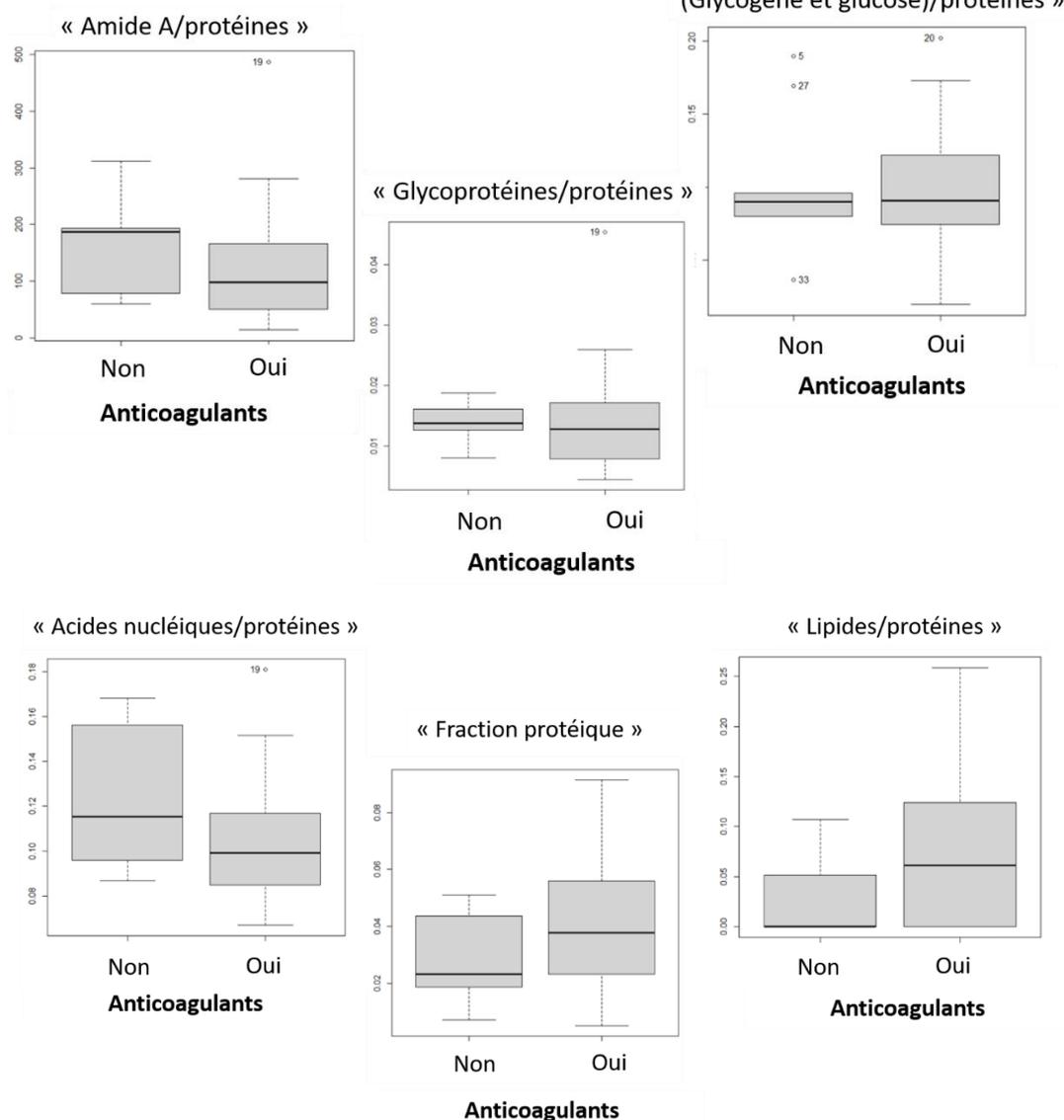
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.02902	0.0008467
Acides nucléiques/protéines	0.0499	0.004053
Glycoprotéines (mucines) /protéines	0.1193	0.000107
Hydrates de carbones (glycogène et glucose) /protéines	0.4193	0.04221
Fraction protéique	0.8157	0.1284
Amide A/protéines	0.0218	0.001559

Annexe 52: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de l'épithélium en fonction des psychotropes



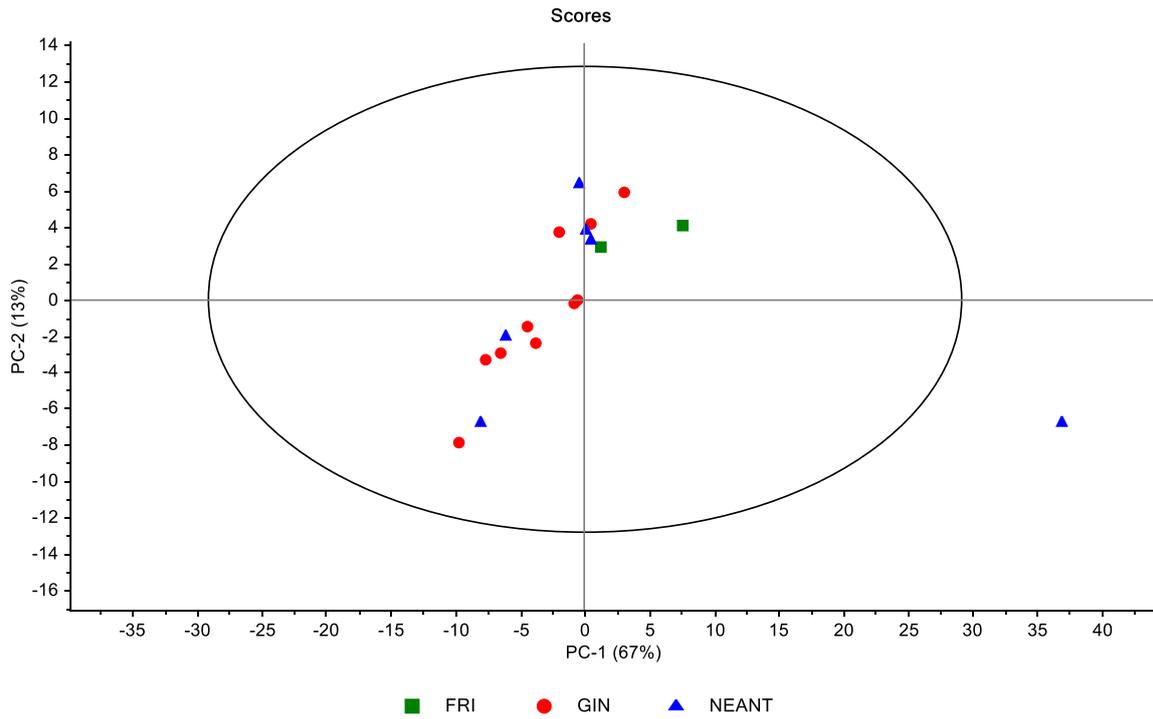
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.2541	0.0008467
Acides nucléiques/protéines	0.06353	0.004053
Glycoprotéines (mucines) /protéines	0.1718	0.000107
Hydrates de carbones (glycogène et glucose) /protéines	0.2139	0.04221
Fraction protéique	0.007099	0.1284
Amide A/protéines	0.01582	0.001559

Annexe 53: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de l'épithélium en fonction des traitements des maladies cardiovasculaires

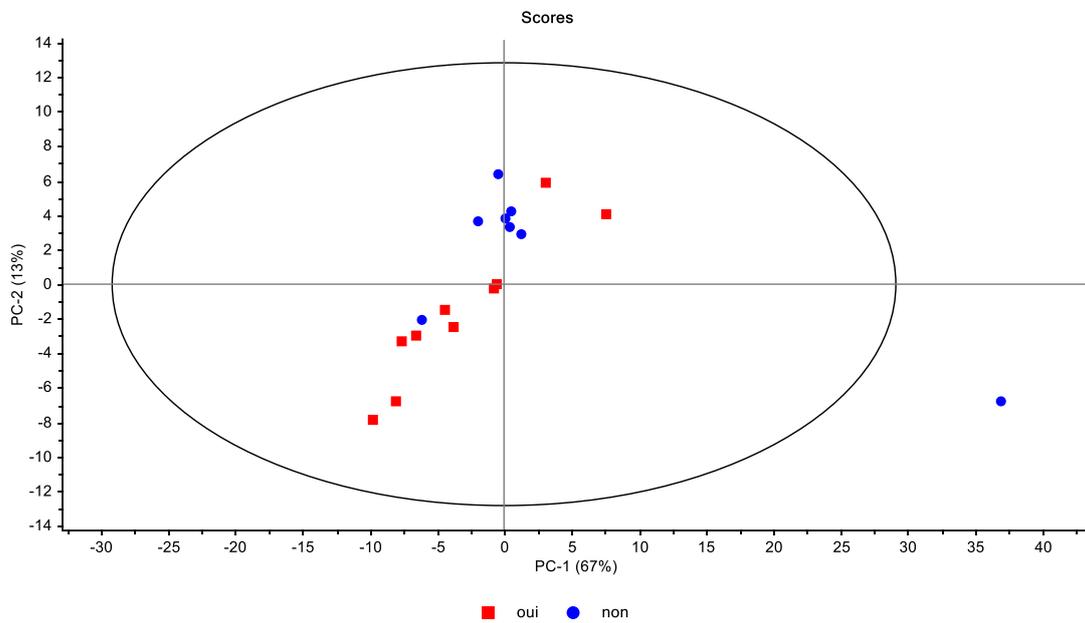


	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Lipides/protéines	0.07144	0.0008467
Acides nucléiques/protéines	0.1854	0.004053
Glycoprotéines (mucines) /protéines	0.08286	0.000107
Hydrates de carbones (glycogène et glucose)/protéines	0.6275	0.04221
Fraction protéique	0.1619	0.1284
Amide A/protéines	0.5121	0.001559

Annexe 54: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de l'épithélium en fonction des anticoagulants

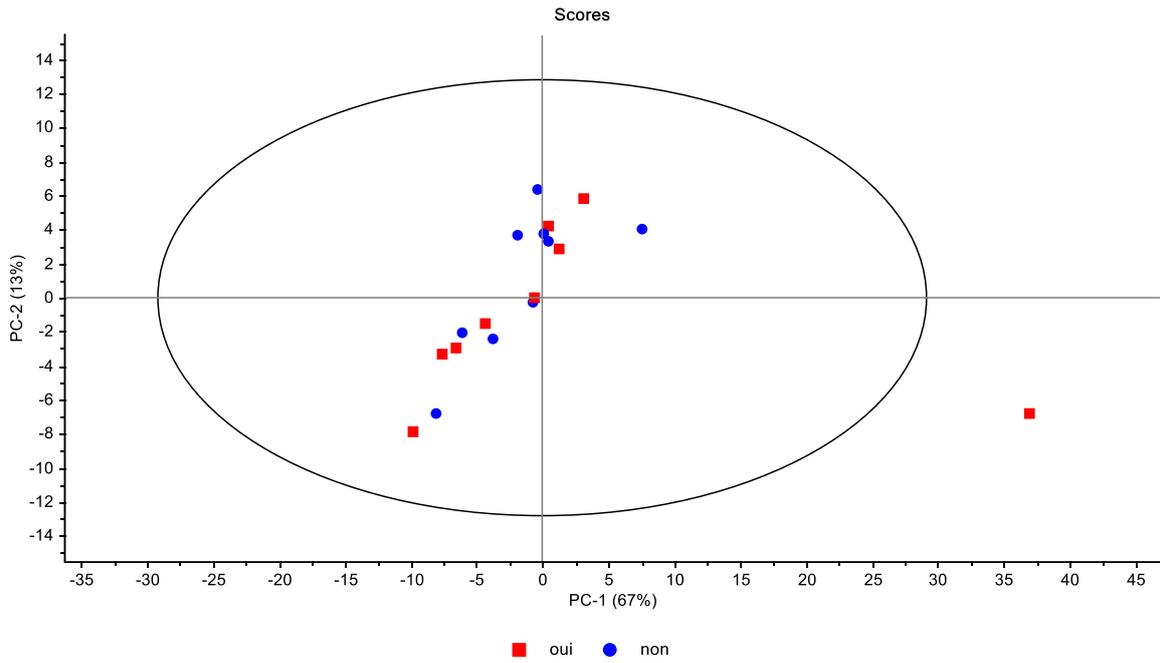


Annexe 55: Projection des profils IRTF des échantillons salivaires sur PC1 et PC2 regroupement suivant les signes cliniques locaux (dans la zone 1800-1000 cm^{-1})

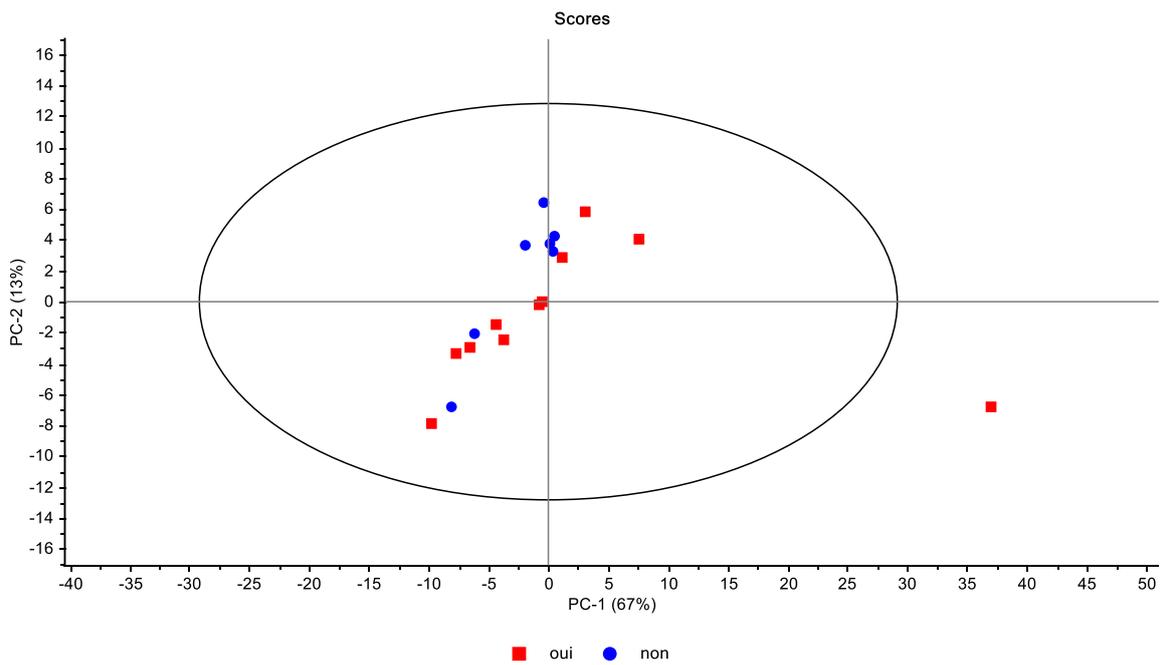


Annexe 56: Projection des profils IRTF des échantillons salivaires sur PC1 et PC2 regroupement suivant le diabète (dans la zone 1800-1000 cm^{-1})

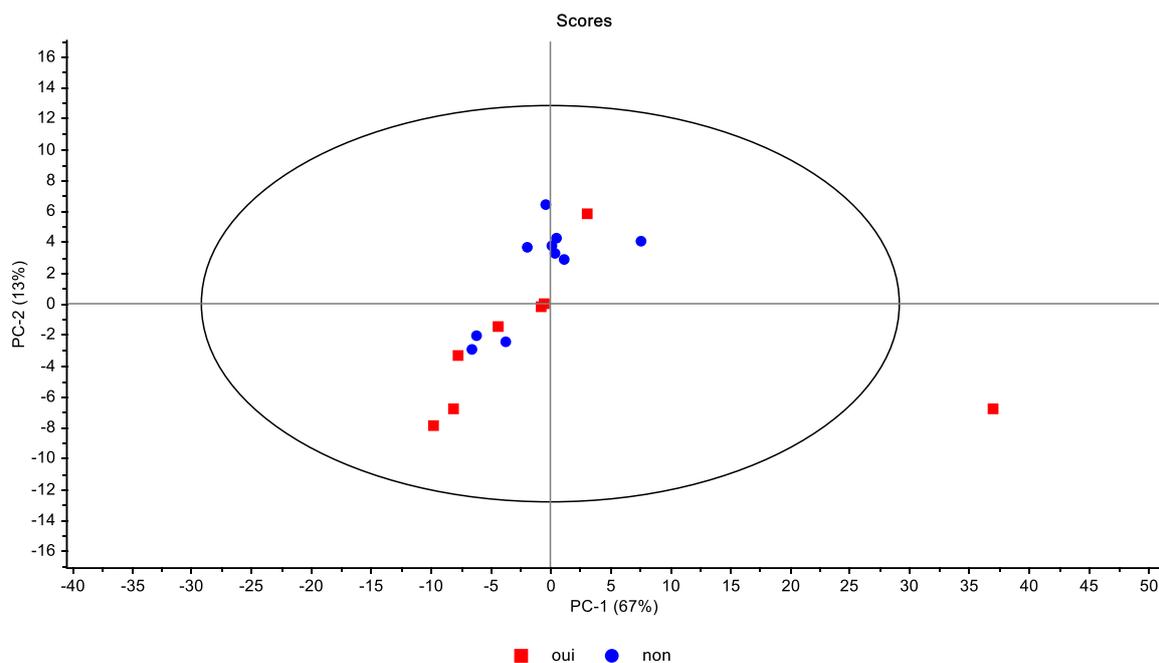
Annexes



Annexe 57: Projection des profils IRTF des échantillons salivaires sur PC1 et PC2 regroupement suivant les maladies cardiovasculaires (dans la zone 1800-1000 cm^{-1})



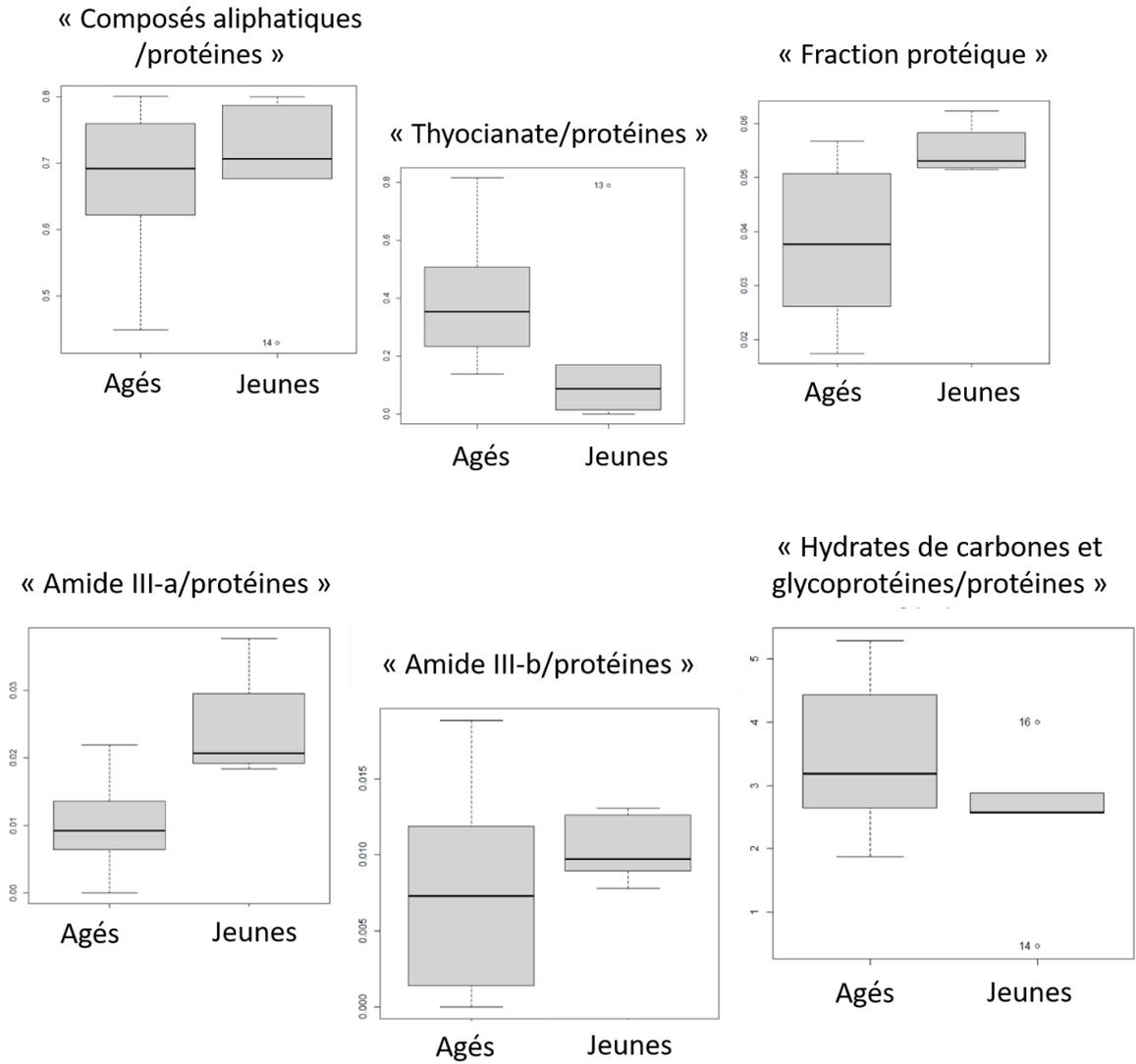
Annexe 58: Projection des profils IRTF des échantillons salivaires sur PC1 et PC2 regroupement suivant la prise d'anticoagulants (dans la zone 1800-1000 cm^{-1})



Annexe 59: Projection des profils IRTF des échantillons salivaires sur PC1 et PC2 regroupement suivant les traitements de maladies cardiovasculaires (dans la zone 1800-1000 cm^{-1})

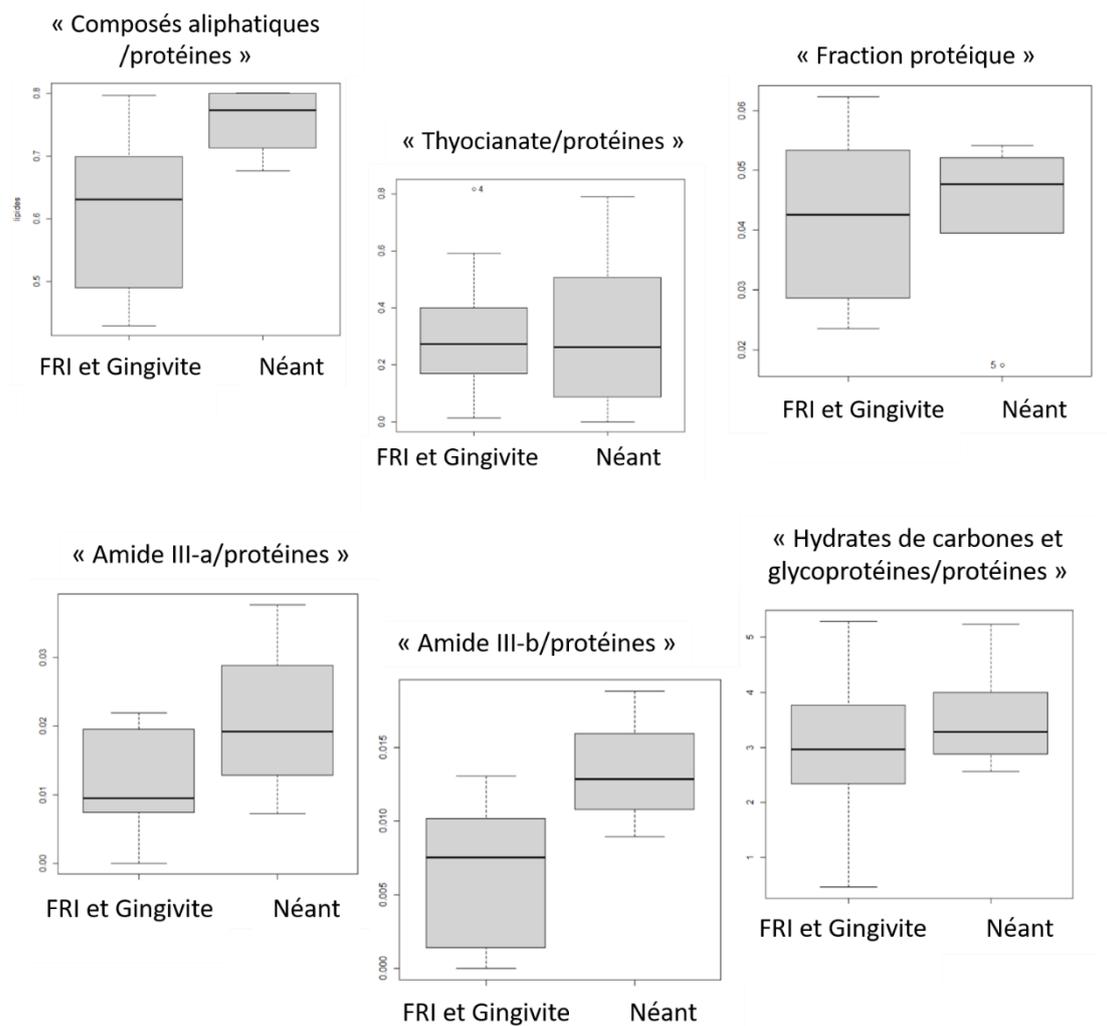
	Composés aliphatiques /protéines	Thiocyanates /protéines	Fraction protéique	Amide III a /protéines	Amide III b /protéines	Hydrates de carbones /protéines
Minimum	0.42	0	0.017	0	0	0.42
1^{er} quartile	0.62	0.15	0.031	0.008	0.006	2.56
Médiane	0.69	0.26	0.046	0.017	0.009	2.96
Moyenne	0.67	0.32	0.042	0.015	0.008	3.19
3^{ème} quartile	0.78	0.45	0.052	0.02	0.012	4
Maximum	0.80	0.81	0.062	0.037	0.018	5.29

Annexe 60: Distributions des marqueurs vibrationnels de la salive



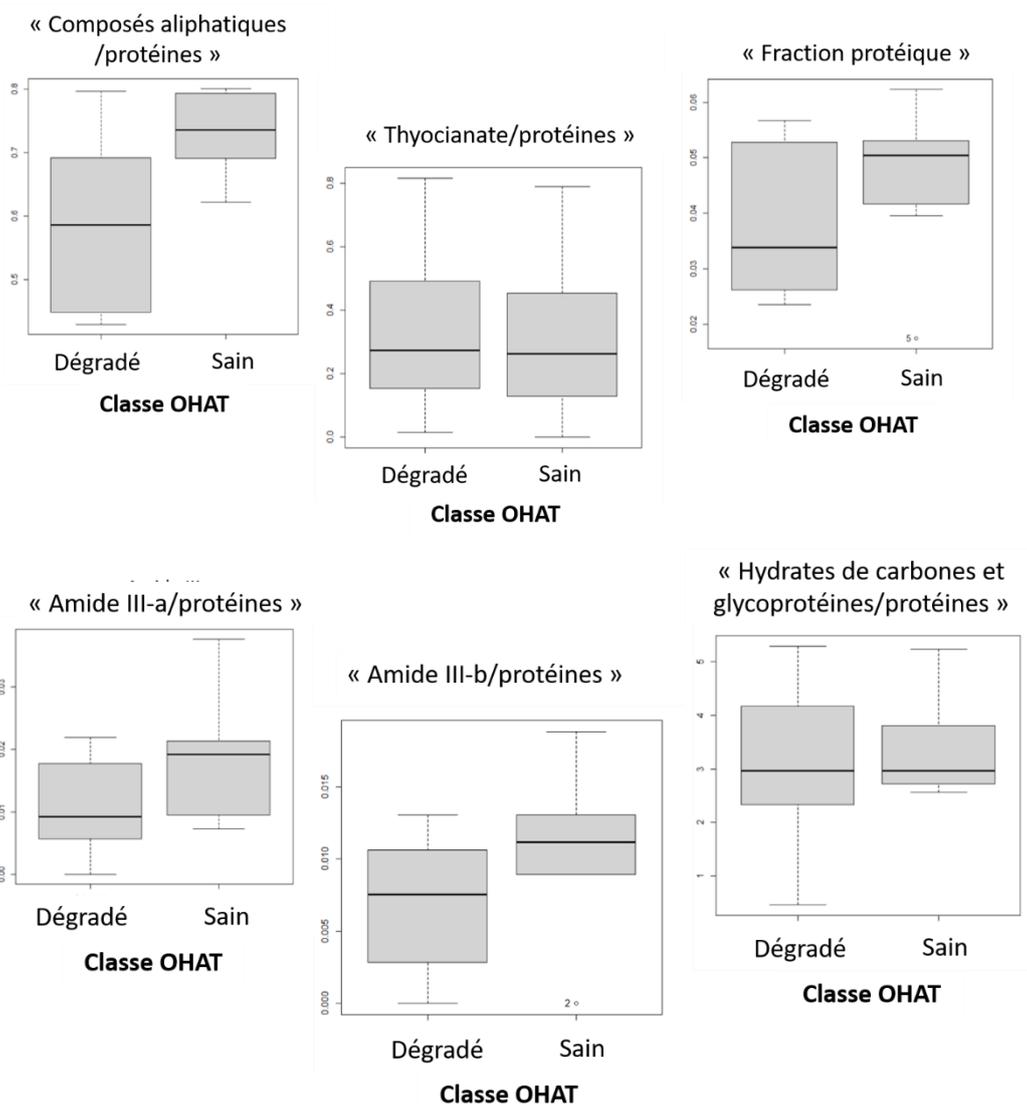
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Composés aliphatiques /protéines	0.875	0.05868
Thyocyanate/protéines	0.4091	0.2433
Fraction protéique	0.03693	0.2088
Amide III - a/protéines	0.6883	0.4971
Amide III - b /protéines	0.04462	0.5863
Hydrates de carbone et glycoprotéines/protéines	0.7594	0.6363

Annexe 61: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la salive en fonction de la classe d'âge



	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Composés aliphatiques /protéines	0.2068	0.05868
Thyocianate/protéines	0.2468	0.2433
Fraction protéique	0.2282	0.2088
Amide III - a/protéines	0.6782	0.4971
Amide III - b /protéines	0.3689	0.5863
Hydrates de carbone et glycoprotéines/protéines	0.8745	0.6363

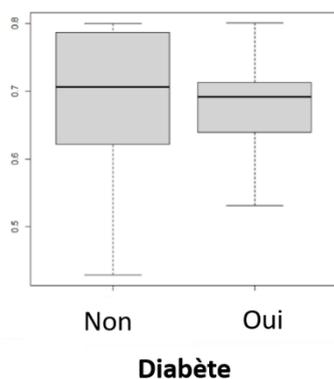
Annexe 62: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la salive en fonction des signes cliniques locaux



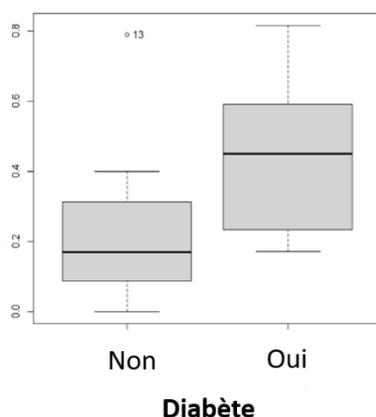
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Composés aliphatiques /protéines	0.01989	0.05868
Thyocianate/protéines	0.8625	0.2433
Fraction protéique	0.5246	0.2088
Amide III - a/protéines	0.9624	0.4971
Amide III - b /protéines	0.7542	0.5863
Hydrates de carbone et glycoprotéines/protéines	0.189	0.6363

Annexe 63: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la salive en fonction du score OHAT

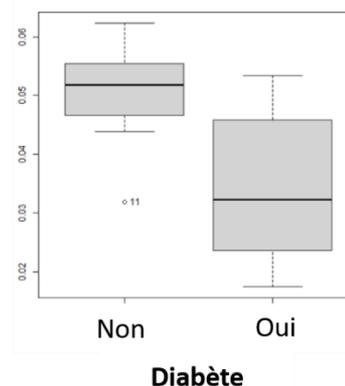
« Composés aliphatiques /protéines »



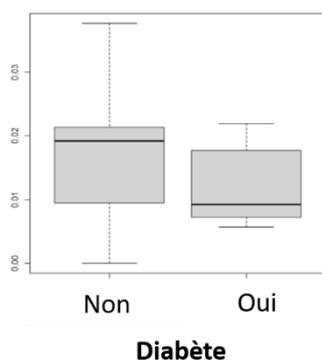
« Thyocyanate/protéines »



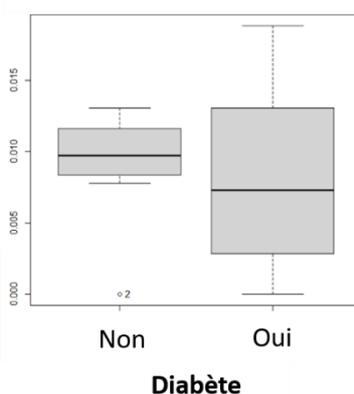
« Fraction protéique »



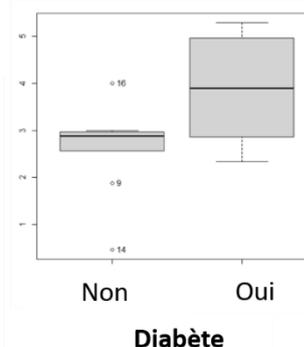
« Amide III-a/protéines »



« Amide III-b/protéines »

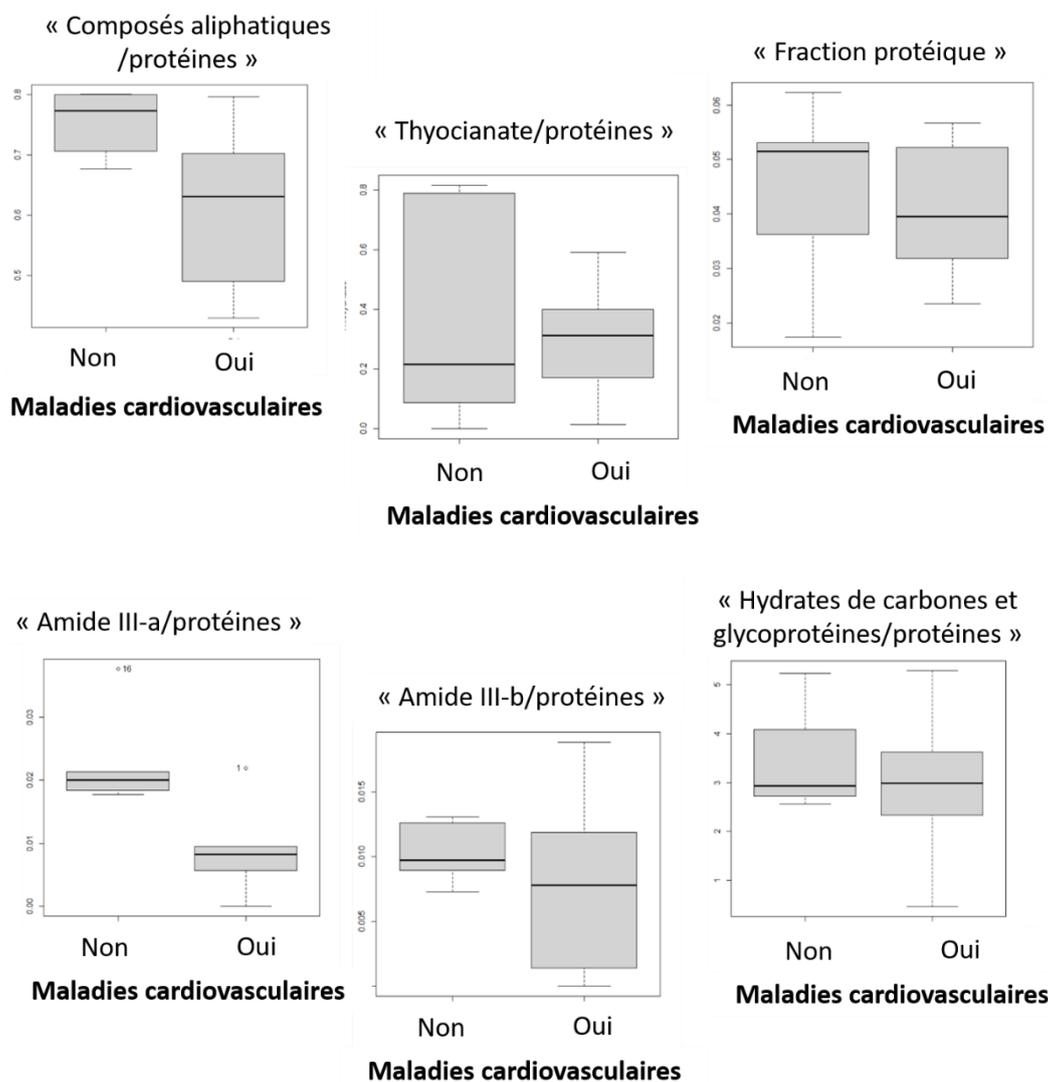


« Hydrates de carbone et glycoprotéines/protéines »



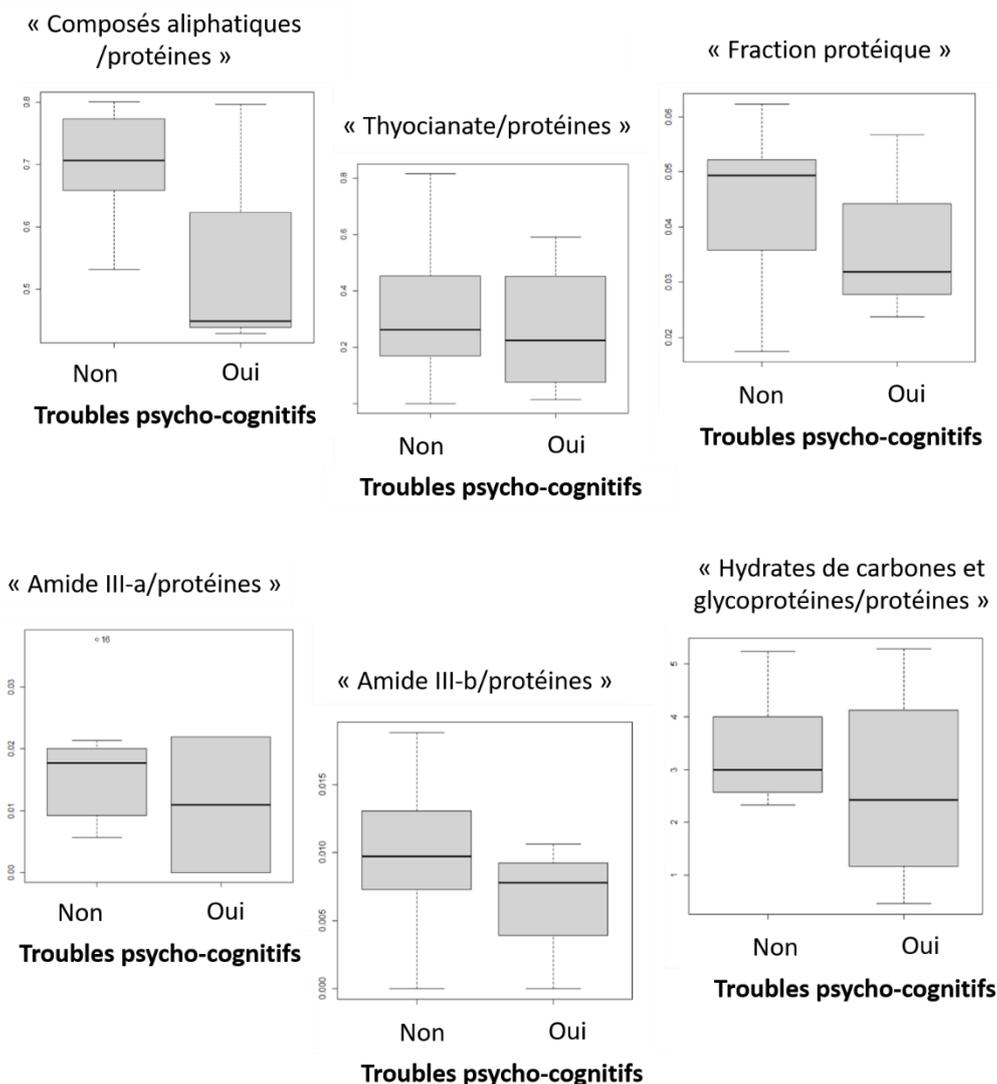
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Composés aliphatiques /protéines	0.3298	0.05868
Thyocyanate/protéines	0.9131	0.2433
Fraction protéique	0.1734	0.2088
Amide III - a/protéines	0.4957	0.4971
Amide III - b /protéines	0.1337	0.5863
Hydrates de carbone et glycoprotéines/protéines	0.3077	0.6363

Annexe 64: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la salive en fonction du diabète



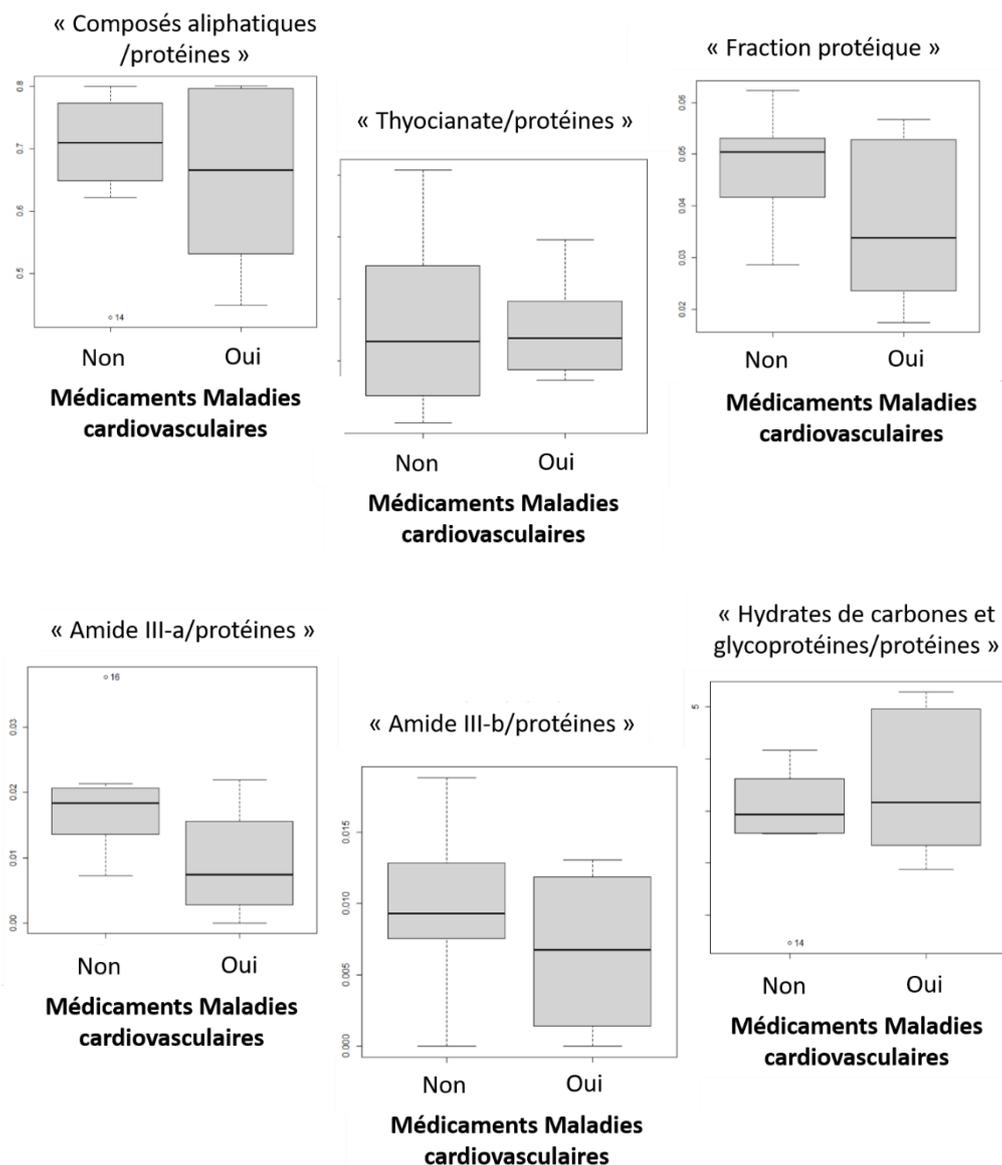
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Composés aliphatiques /protéines	0.05105	0.05868
Thyocianate/protéines	0.03074	0.2433
Fraction protéique	0.7	0.2088
Amide III - a/protéines	0.7002	0.4971
Amide III - b /protéines	0.05072	0.5863
Hydrates de carbone et glycoprotéines/protéines	0.6862	0.6363

Annexe 65: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la salive en fonction des maladies cardiovasculaires



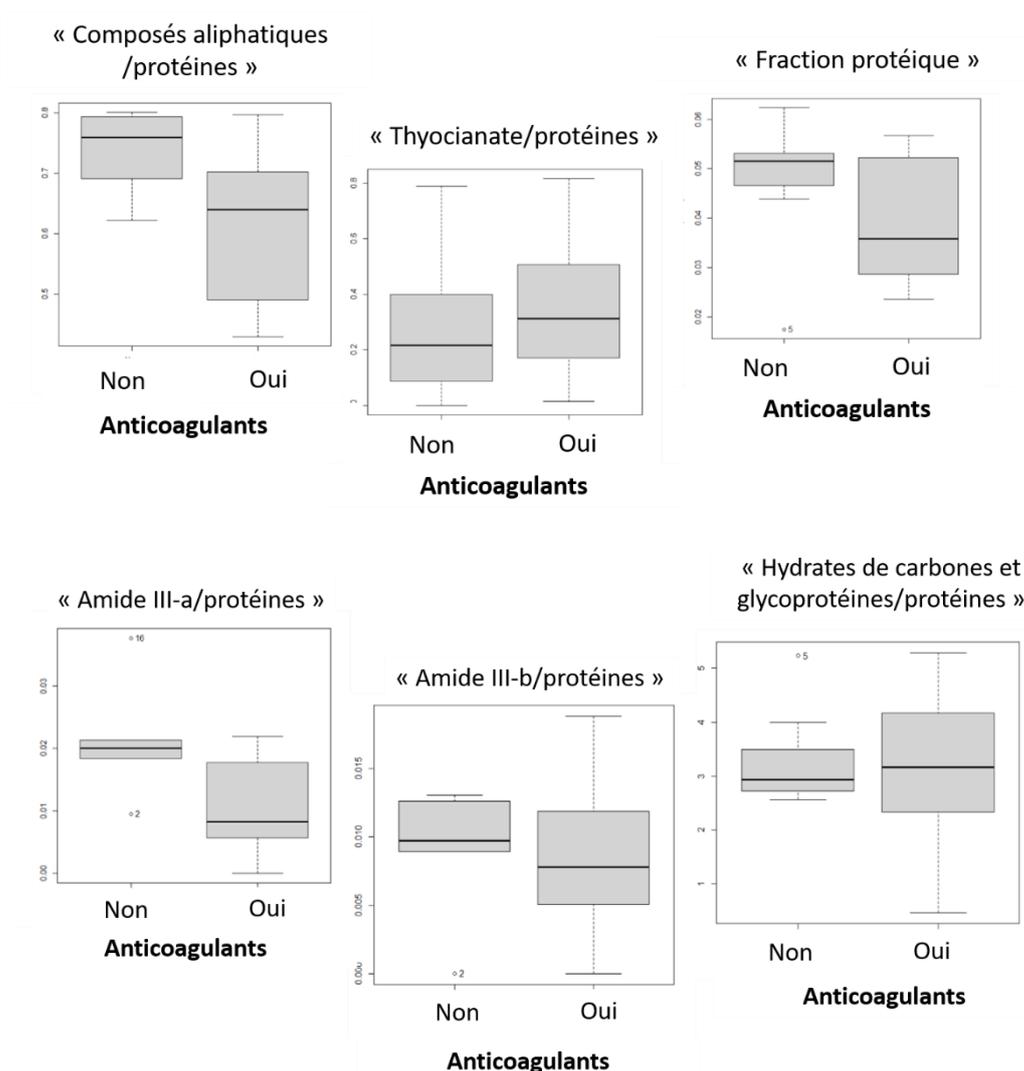
	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Composés aliphatiques /protéines	0.01894	0.05868
Thyocyanate/protéines	0.7786	0.2433
Fraction protéique	0.6955	0.2088
Amide III - a/protéines	0.4501	0.4971
Amide III - b /protéines	0.93	0.5863
Hydrates de carbone et glycoprotéines/protéines	0.07375	0.6363

Annexe 66: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la salive en fonction des troubles psycho-cognitifs



	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Composés aliphatiques /protéines	0.5055	0.05868
Thyocyanate/protéines	0.08272	0.2433
Fraction protéique	0.1254	0.2088
Amide III - a/protéines	0.9895	0.4971
Amide III - b /protéines	0.4801	0.5863
Hydrates de carbone et glycoprotéines/protéines	0.1939	0.6363

Annexe 67: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la salive en fonction des traitements de maladies cardiovasculaires

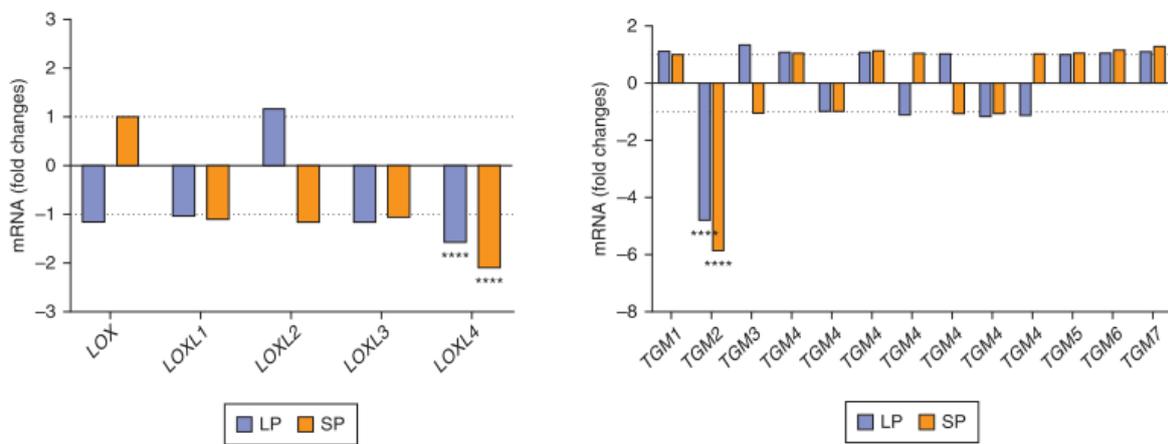


	Homogénéité des variances (p-value)	Normalité (p-value)
Composés aliphatiques /protéines	0.03352	0.05868
Thyocyanate/protéines	0.9261	0.2433
Fraction protéique	0.7606	0.2088
Amide III - a/protéines	0.9611	0.4971
Amide III - b /protéines	0.5809	0.5863
Hydrates de carbone et glycoprotéines/protéines	0.3157	0.6363

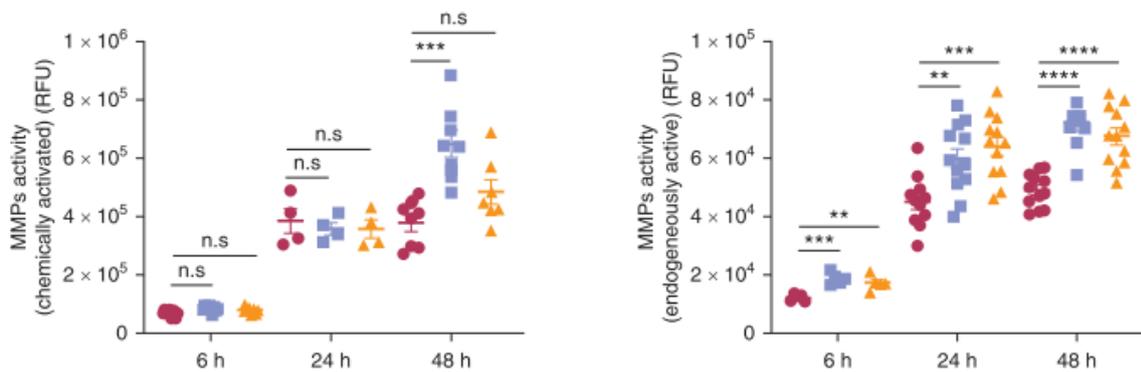
Annexe 68: Boîtes de dispersion, test d'homogénéité des variances et test de normalité des indicateurs vibrationnels de la salive en fonction des anticoagulants

	Valeur du plateau G'(Pa)	Valeur du plateau G''(Pa)	Valeur de déformation γ_c (%)
Minimum	2066	303	0.29
1^{er} quartile	2642	499	0.46
Médiane	5127	759	0.61
Moyenne	4996	955	0.58
3^{ème} quartile	6620	1341	0.74
Maximum	8851	1863	0.88

Annexe 69: Distribution des marqueurs mécaniques de la muqueuse buccale humaine



Annexe 70: Teneur en hydroxyproline dans le substitut dermique entier mesurée au cours du temps après électrostimulation (à gauche) et Dosage par ELISA du procollagène Ia1 dans les surnageants (à droite) [234]



Annexe 71: Activité globale des MMP quantifiée par fluorimétrie après activation chimique de toutes les pro-MMP présentes dans le surnageant (à gauche) et quantification par fluorimétrie des MMP endogènes actives dans le surnageant (à droite) [234]



**Modifications Moléculaires et Organisationnelles de
la muqueuse BUCCale humaine lors du
vieillessement**

MMOBUCC

CAHIER D'OBSERVATION

VISITE PRE-INCLUSION (V0)

Recueil d'informations

Visite réalisée par (nom de l'intervenant) :

.....

Date : |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|

Procéder à la vérification des coordonnées du patient, de sa personne de confiance, famille ou son représentant légal (*personne référente sur l'étude*) et son médecin traitant (cf fiche de renseignements).

Caractéristiques sociodémographiques

Date de naissance : |_|_|/|_|_|_|_|

Mois *Année*

Sexe : Masculin Féminin

Mesure de protection juridique : Aucune Curatelle Tutelle

Information

La notice d'information a-t-elle été remise au patient ? Oui Non Ne sait pas

Si non ou ne sait pas, procéder à un envoi par mail ou par courrier.

Date d'envoi : |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|

Vérification des critères d'inclusion et de non-inclusion

Critères d'inclusion

	Oui	Non
Patient devant subir un acte de chirurgie dentaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patient correspondant aux groupes d'âge (20-40 ans ou 70-90 ans)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patient (ou sa personne de confiance, sa famille, son représentant légal) ayant donné leur accord pour la participation à l'étude	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patient affilié à un régime de sécurité sociale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Si vous avez répondu « NON » à l'une des questions ci-dessus,
le patient ne doit pas être inclus.**

Critères de non-inclusion

	Oui	Non
Patient porteur d'une sonde de gastrostomie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patient en cure de chimiothérapie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patient en soins palliatifs (ou ayant une espérance de vie inférieure à 30 jours)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patient avec contre-indication chirurgicale : - allergie aux anesthésiques locaux, - risque hémorragique majeur : patient sous AVK non équilibré, patient sous nouveaux anticoagulants non relayés ou non interrompus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patient à haut risque d'endocardite infectieuse (Recommandations de l'ANSM 2011), c'est-à-dire présentant : - une immunodépression d'origine congénitale ou acquise, - un antécédent d'endocardite infectieuse, - une prothèse valvulaire, - une cardiopathie congénitale cyanogène	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patient sous sauvegarde de justice	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Si vous avez répondu « OUI » à l'une des questions ci-dessus,
le patient ne doit pas être inclus.**

Eligibilité

Au vu des informations recueillies jusque-là, le patient est-il éligible à l'inclusion dans l'étude ?

Oui **Non**

Consentement

Après avoir été informé des modalités du protocole, le patient donne son consentement pour participer à l'étude :

Oui **Non**

Si oui, compléter les informations en fin de notice d'information, envoyer une copie du document au patient par courrier.

Date de l'information : |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|

Date du consentement : |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|

Si non, ne pas poursuivre.

VISITE INCLUSION (V1)

Recueil d'informations

Visite réalisée par (nom de l'intervenant) :
.....

Date : |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|

Antécédents médicaux et pathologies associées (1/2)

- Tableau de l'indice de comorbidité de Charlson

Antécédents	Oui	Non	Ne sait pas
Infarctus du myocarde	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Insuffisance cardiaque congestive	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Maladie vasculaire périphérique (y compris les anévrismes)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Accident vasculaire cérébral (sans déficit ou déficit léger) ou accident ischémique transitoire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Démence	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Maladie pulmonaire chronique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Connectivite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ulcère gastro-duodéal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hépatopathie légère (sans hypertension portale, incluant les hépatites chroniques)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabète non compliqué	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Accident vasculaire cérébral avec hémiplégie séquellaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Insuffisance rénale modérée et sévère	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabète compliqué (avec atteinte d'organe cible)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tumeur sans métastase avec recul < 5 ans	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leucémie aiguë ou chronique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lymphome, myélome	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hépatopathie modérée à sévère	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cancer métastasé	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sida déclaré	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hémodialysé	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Antécédents médicaux et pathologies associées (2/2)

Antécédents	Oui	Non	Ne sait pas
▪ Facteurs de risque vasculaires	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Hypertension artérielle traitée	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Hypercholestérolémie traitée	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Trouble du rythme cardiaque	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Autres facteurs de risque vasculaires	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si oui, lesquels ?			
.....			
.....			
▪ Antécédents personnels neurologiques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Maladie de Parkinson	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Epilepsie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Autres antécédents neurologiques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si oui, lesquels ?			
.....			
.....			
▪ Antécédents personnels psychiatriques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Dépression	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Maladie bipolaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Maladie psychotique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Episode confusionnel aigu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Autres maladies psychiatriques Si oui, lesquelles ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....			
.....			
▪ Antécédents de fracture	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Ostéoporose fracturaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Fracture de la hanche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Fracture des vertèbres	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
- Autres fractures	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si oui, lesquelles ?			
.....			
.....			

Traitements médicamenteux et non médicamenteux

Codage des voies d'administration

AU = Auriculaire
IA = Intra articulaire
ID = Intradermique
IM = Intramusculaire
IN = Inhalation
IP = Intrapéritonéale
IR = Intra artérielle
IV = Intraveineuse
LO = Locale
NS = Nasale

OP = Ophtalmique
OR = Orale
PC = Percutanée
PF = Perfusion continue
PL = Perlinguale
RE = Rectale
SC = Sous-cutanée
VA = Vaginale
NK = Voie indéterminée

Codage des posologies journalières

amp = Ampoule	mEq = Milliéquivalent
amp. buv = Ampoule buvable	mg = Milligramme
càc = Cuillère à café	mg/kg = Milligramme par kilo de poids
càd = Cuillère à dessert	ml = Millilitre (=0,001 litre)
càs = Cuillère à soupe	mm³ = Millimètre cube
cap = Capsule	mmol = Millimole
cp = Comprimé	mOsm = Milliosmole
cp.sec = Comprimé sécable	MUI = Million d'unités internationales
cp. gyn = Comprimé gynécologique	µg = Microgramme
cg = Centigramme (=0,01 gramme)	µmol = Micromole
fl = Flacon	ng = Nanogramme
g = Gramme	qs = Quantité suffisante
g/j = Gramme par jour	qsp = Quantité suffisante pour
g/kg = Gramme par kilo de poids corporel	sac = Sachet
g/l = Gramme par litre	sem = Semaine
gél = Gélule	sol = Solution
gte = Goutte	sol.buv = Solution buvable
h = Heure	suppo = Suppositoire
j = jour	susp = Suspension
Kg = Kilogramme	susp.buv = Suspension buvable
l = Litre	U = Unité
m² = Mètre carré	UI = Unité internationale

Oral Health Assessment Tool (OHAT)

Lèvres	Lisse, rose, humide	<input type="checkbox"/> ₀
	Sèche, gercée, rougeur angulaire	<input type="checkbox"/> ₁
	Morsure, gonflée, ulcération, saignement angulaire	<input type="checkbox"/> ₂
Langue	Normale, humide, rugueuse, rose	<input type="checkbox"/> ₀
	Irrégulière, fissurée, rouge, dépôt	<input type="checkbox"/> ₁
	Ulcérations, gonflée	<input type="checkbox"/> ₂
Gencive, Muqueuse	Lisse, rose, humide, aucun saignement	<input type="checkbox"/> ₀
	Sèche, brillante, rugueuse, gonflée, blessure ou ulcère sous prothétique	<input type="checkbox"/> ₁
	Gonflée, saignement, ulcération, zones rouges ou blanches, érythème sous prothétique	<input type="checkbox"/> ₂
Salive	Tissus humides, flux correct	<input type="checkbox"/> ₀

	Peu de salive, collante, sensation de bouche sèche exprimée par le patient	<input type="checkbox"/> ₁
	Muqueuses parcheminées et rouges, peu ou pas de salive, salive épaisse, sensation de bouche sèche exprimée par le patient	<input type="checkbox"/> ₂
Dents naturelles	Aucune carie, racine ou dent cassée	<input type="checkbox"/> ₀
	1-3 caries, racine ou dents cassées, dents usées, abrasées	<input type="checkbox"/> ₁
	+ de 4 caries, racine ou dents cassées, dents usées, abrasées	<input type="checkbox"/> ₂
	- de 4 dents présentes	
Prothèses	Prothèse adaptée, portée, Prothèse non nécessaire	<input type="checkbox"/> ₀
	Prothèse partiellement inadaptée, portée 1-2 heures par jour, prothèses perdues	<input type="checkbox"/> ₁
	Prothèse inadaptée, prothèse non portée, utilisation de colle	<input type="checkbox"/> ₂
Hygiène buccale	Propre, aucun dépôt, tartre sur les dents et les prothèses	<input type="checkbox"/> ₀
	Présence partielle de plaque, dépôts, tartre sur les dents ou les prothèses, halitose	<input type="checkbox"/> ₁
	Présence de plaque, dépôts, tartre sur la totalité des dents ou des prothèses, halitose importante	<input type="checkbox"/> ₂
Douleur	Aucun signe de douleur	<input type="checkbox"/> ₀
	Signes douloureux exprimés et/ou comportementaux (mimique, mâchonnement, agressivité, refus de manger)	<input type="checkbox"/> ₁
	Signes douloureux objectifs (morsure, gonflement, dents cassées) + Signes douloureux exprimés et/ou comportementaux (mimique, mâchonnement, agressivité, refus de manger)	<input type="checkbox"/> ₂
SCORE TOTAL /16		
OHAT \leq 4, état buccodentaire sain		

Sain = 0, Modifications = 1, Non sain = 2

SCORE TOTAL : |_|_|

Indice d'Hygiène OHI (Oral Health Index) modifié

Pas de plaque	<input type="checkbox"/> ₀
Présence de plaque au niveau du sillon + espaces inter-dentaires libres	<input type="checkbox"/> ₁
Présence de plaque sur 1/3 couronne + espaces inter-dentaires encombrés	<input type="checkbox"/> ₂
Présence de plaque sur la 2/3 couronne + espaces inter-dentaires obturés	<input type="checkbox"/> ₃
SCORE TOTAL /3 OHI > 0, facteur de risque inflammatoire	

SCORE TOTAL : |_|_|

Indice de saignement SBI (Sulcus Bleeding Index) modifié

Normal - pas de saignement	<input type="checkbox"/> ₀
Saignement au brossage	<input type="checkbox"/> ₁
Saignement spontané	<input type="checkbox"/> ₂
SCORE TOTAL /2 SBI > 0 et OHI > 0 = gingivite	

SCORE TOTAL : |_|_|

Prélèvement de muqueuse buccale

Type d'acte de chirurgie dentaire :

- Extractions ₁
- Implants ₂
- Autres ₃ Précisez :.....

Site de prélèvement :

Maxillaire	vestibulaire	<input type="checkbox"/> ₁
	palatin	<input type="checkbox"/> ₂
	crestal	<input type="checkbox"/> ₃
Mandibulaire	vestibulaire	<input type="checkbox"/> ₁
	lingual	<input type="checkbox"/> ₂
	crestal	<input type="checkbox"/> ₃

Prélèvement de Salive

- Prélèvement réalisé oui
- non

Si non, pour quelles raisons ?

.....

.....

.....

Evénements indésirables

Un évènement indésirable est-il survenu ? Oui Non

Si oui, remplir les champs suivants (du plus ancien au plus récent) :

Évènement	Date de début	Date de fin ou En cours	Code de gravité 1 : Grave 2 : Non grave <i>Si grave compléter le formulaire d'EIG</i>	Intensité 1 : Légère 2 : Modérée 3 : Sévère	Imputabilité à l'étude 1 : Exclue 2 : Douteuse 3 : Possible 4 : Liée	Action 1 : Aucune 2 : Traitement symptomatique 3 : Hospitalisation 4 : Autre	Evolution 1 : Guérison sans séquelles 2 : Guérison avec séquelles 3 : Non encore rétablie 4 : Décès 5 : Inconnue	Sortie d'étude 1 : Oui 2 : Non <i>Si oui, compléter le formulaire de sortie d'étude</i>
	_ _ / _ _ /	_ _ / _ _ /	_	_	_	_	_	_
	_ _ / _ _ /	_ _ / _ _ /	_	_	_	_	_	_

Annexes

	<p>□□□/□□□/</p> <p>□□□□□</p> <p>□ En cours</p>	<p>□□□/□□□/</p> <p>□□□□□</p> <p>□ En cours</p>	□	□	□	□	□	□
	<p>□□□/□□□/</p> <p>□□□□□</p> <p>□ En cours</p>	<p>□□□/□□□/</p> <p>□□□□□</p> <p>□ En cours</p>	□	□	□	□	□	□

Thesis Summary

With aging, the different layers of epithelial and connective tissues suffer several changes. Physiological aging is marked by epithelium thickening, basal crest flattening and alteration of the hydric distribution. The main components of the extracellular matrix (collagens, proteoglycans, glycosaminoglycans, etc) can also be subjected to structural modifications and density variation.

The major purpose of this thesis, carried out in collaboration with the CHU of Toulouse, was to analyse the hydric organization and the changes of oral mucosa at the molecular and supramolecular level, with aging and physio-pathological evolution.

As a first step the use of infra-red spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and dynamic mechanical analyses (DMA) has been validated on porcine oral mucosa samples. It led to a better understanding of the biophysical behaviour of the oral mucosa and to the identification of specific biomarkers.

After this feasibility study, the evolution of vibrational, thermal and mechanical signatures of human oral mucosa with physio-pathological aging has been monitored via a clinical study involving patients from two age groups (20-40 and 70-90 years old). Correlations between the evolution of mucosa biophysics markers, the age and clinical data have been evidenced.

Academic collaborations, performed at the same time as our main research axis, have confirmed the reliability of the protocol developed for oral mucosa and its application to the characterization of dermal sample from animal models and tissue cellular engineering.

This better knowledge of the structure-properties relationship in epithelial-connective tissues will be useful to the specification drafting of ideal prosthetic biomaterial or even the development of oral mucosa repair tissues.

Auteur : Camille OBER

Titre : Caractérisation de tissus épithélio-conjonctifs : analyse des marqueurs moléculaires et organisationnels en condition physio-pathologique

Directrice et co directrice de thèse : Dr Valérie SAMOUEILLAN et Dr Marie-Hélène LACOSTE FERREE

Résumé :

L'objectif de ce travail de thèse, effectuée en partenariat avec le CHU de Toulouse, est d'analyser les modifications de la matrice extracellulaire et l'organisation hydrique des tissus épithélio-conjonctifs, avec l'âge, les signes cliniques locaux et les pathologies générales.

Afin de mieux comprendre le comportement biophysique de la muqueuse buccale et d'identifier les biomarqueurs spécifiques de ces tissus, nous avons validé l'utilisation de la spectroscopie infra-rouge (IRTF), de l'analyse calorimétrique diatherme (ACD), de la technique des courants thermostimulés (CTS) et de l'analyse mécanique dynamique (AMD) sur des échantillons porcins.

Grâce à cette étude préliminaire, nous avons ensuite suivi l'évolution des réponses vibrationnelles, thermiques et mécanique de biopsies de muqueuses buccales humaines au cours du vieillissement physio-pathologique via une étude clinique portant sur des sujets de deux groupes d'âge (20-40 ans et 70-90 ans). L'évolution des marqueurs de la muqueuse buccale avec l'âge et les données cliniques ont permis de comprendre les différents mécanismes mis en jeu.

Mots-clés : tissus épithélio-conjonctifs, vieillissement physio-pathologique, organisation hydrique, matrice extracellulaire