

RÉSUMÉ

OSTÉOINTÉGRATION DE L'IMPLANT DENTAIRE SUR UN MODÈLE ANIMAL EXPÉRIMENTAL DE PARODONTIE ET ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DU MÉDICAMENT ANTI-REJET

Doctorante : DASCĂLU (ANCUȚA) Diana-Larisa

Coordinatrice scientifique : Prof. Univ. Dr. CRIVINEANU Maria

MOTS-CLÉS : *maladie parodontale, péri-implantite, microbiome, lysat bactérien, modèle animal*

La thèse de doctorat intitulée „*Ostéointégration de l'implant dentaire sur un modèle animal expérimental de parodontite et évaluation de l'efficacité du médicament anti-rejet*”, avait pour objectif principal l'évaluation de l'efficacité des lysats bactériens sur la maladie parodontale et la péri-implantite sur un modèle expérimental. Modèle de rat. Puisque ces deux pathologies impactent globalement la population, nous avons entrepris de reproduire les maladies, dans un modèle animal, à partir de souches bactériennes isolées de la cavité buccale de patients humains, dans le but de contribuer à la compréhension des mécanismes physio-pathogéniques et de contribuer à l'optimisation. Schémas thérapeutiques actuels de la parodontite et de la péri-implantite.

Les études expérimentales présentées dans cet article ont successivement décrit la manière d'induire la maladie parodontale, le développement de la maladie péri-implantaire, suivie de l'exposition de la technique d'obtention de lysats bactériens et de l'évaluation *in vitro* de leur efficacité. Dans la dernière partie de la recherche, nous avons cherché à suivre les résultats obtenus à la suite de l'administration de lysats bactériens sur les parodontites et péri-implantites.

Les objectifs de la thèse de doctorat étaient multiples et comprenaient : l'induction d'une parodontite chez un modèle expérimental de rat par la méthode de ligature des incisives supérieures avec du fil de coton, suivie d'une contamination par des bactéries isolées du microbiome buccal humain. Le deuxième objectif portait sur l'induction de péri-implantite chez le modèle expérimental de rat par l'insertion d'implants en titane au niveau de la première molaire maxillaire, suivie d'une contamination orale par des bactéries sélectionnées dans la flore buccale des patients souffrant de la maladie parodontale et/ou péri-implantaire. Un troisième objectif de nos recherches était de créer un traitement immuno-stimulateur à base de lysats bactériens obtenus par ultrasonication des souches bactériennes responsables des parodontites et de péri-implantites. Enfin, nous avons vérifié l'influence des lysats bactériens sur l'inhibition de l'activité des microorganismes pathogènes impliqués dans le développement des deux maladies bucco-dentaires.

La thèse répond aux dispositions actuelles en matière de structuration et comprend deux parties. Dans la première partie sont exposées les données importantes résultant de l'étude bibliographique et la deuxième partie est une recherche personnelle.

La première partie présente les dernières données sur la maladie parodontale et la péri-implantite en termes d'étiologie, de méthodes de diagnostic et de traitement applicables à la recherche humaine et expérimentale sur des modèles animaux. L'importance de cette partie réside dans la compréhension des mécanismes par lesquels les maladies s'établissent, dans la connaissance des facteurs de risque, mais surtout dans la compréhension de la contribution des animaux au progrès de la science. L'étude bibliographique est systématisée en quatre chapitres, avec un nombre de 52 pages qui représentent environ un tiers de l'information totale présentée.

Le chapitre I généralement intitulé „*La maladie parodontale*” fournit des données actuelles sur l'étiopathogénie de la maladie parodontale, les facteurs de risque associés ainsi que son influence sur la santé systémique. Les mécanismes immunopathogènes déclenchés par la maladie parodontale sont rapportés dans ce

chapitre, tout comme les modèles animaux utilisés dans la recherche sur la pathogenèse, le diagnostic et les thérapies testées. Nous avons également précisé les principales méthodes par lesquelles la parodontite peut être induite dans le modèle animal, afin de donner une perspective sur le choix de la bonne technique, en fonction du but recherché. Les méthodes actuelles fournies par la littérature spécialisée, qui établissent le diagnostic de la maladie parodontale et son traitement, chez l'homme et l'animal, ont été d'une grande utilité, tant pour la recherche propre que pour les études futures dans le domaine.

Le chapitre II, comme le précédent, est appelé génériquement „*Péri-implantite*” et décrit brièvement les notions concernant le terme péri-implantite, les facteurs étiologiques et épidémiologiques qui conduisent à cette affection. Les tissus entourant les implants sont des éléments clés pour le succès d'intervention de ce type et constituent un défi majeur pour la dentisterie contemporaine. En exposant l'immunopathogenèse, les médiateurs inflammatoires ainsi que la susceptibilité génétique individuelle au développement d'une maladie péri-implantaire, l'état d'un patient et le résultat des thérapies appliquées peuvent être évalués. Ce chapitre se concentre sur les facteurs affectant la perte d'implants et discute en détail des méthodes de diagnostic applicables aux humains et aux animaux utilisés dans la recherche sur les implants. Dans ce dernier, les principales méthodes d'induction et d'évaluation de la péri-implantite sont abordées, car dans ce domaine également, les animaux offrent un soutien solide pour l'acquisition de nouvelles connaissances. En conclusion, les protocoles thérapeutiques actuels comprenant des techniques non chirurgicales et chirurgicales, humaines et animales sont détaillés ainsi que les dernières preuves permettant de garantir la qualité de vie liée à la santé bucco-dentaire chez les patients porteurs d'implants dentaires.

Le chapitre III s'intitule „*Éléments communs et différenciateurs entre la maladie parodontale et la péri-implantite*” et a pour rôle d'exposer exactement les informations liées à l'implication du microbiote buccal et à sa composition dans le développement des deux maladies, ce qu'il faut exactement prendre en compte lorsqu'un patient est confronté à un chevauchement de conditions et surtout quelles sont les similitudes et les différences entre les études cliniques et expérimentales. Dans le dernier sous-chapitre, sont résumés les éléments importants pour les chercheurs dans le domaine de l'implantologie qui peuvent être pris en compte lors du test de la biocompatibilité d'un implant ou de l'évaluation d'un nouveau protocole thérapeutique, à l'aide de modèles animaux.

Le chapitre IV aborde un sujet relativement nouveau pour la dentisterie aujourd'hui, à savoir „*Le lysat bactérien comme traitement potentiel de la maladie parodontale et de la péri-implantite*”. Les mécanismes moléculaires et immunologiques par lesquels les lysats bactériens agissent ainsi que leur utilisation et leurs effets dans le traitement des maladies parodontales sont présentés ici. A travers la multitude de similitudes entre maladie parodontale et péri-implantite, nous avons souhaité extraire toutes les informations liées au potentiel thérapeutique des lysats bactériens et sur la péri-implantite, dans la littérature décrivant le rôle immunostimulateur des lysats sur les maladies bucco-dentaires, en l'absence de suffisamment de données pour aborder le sujet de la maladie péri-implantaire.

Dans la **partie II**, la propre recherche est présentée, structurée selon le but et les objectifs proposés. Ainsi, dans les quatre chapitres, nous avons décrit quatre études expérimentales, dont trois réalisées sur le modèle animal rat, et une *in vitro*. Chacun des sous-chapitres respecte l'ordre d'exposition de la procédure expérimentale, les conclusions générées et les recommandations basées sur les résultats obtenus. Cette partie représente plus de 70% du volume total de la thèse, étant rapportée en 94 pages dans lesquelles sont inclus 10 tableaux et 77 figures. Toutes les recherches sont constituées de sous-chapitres abordant les notions introductives, les matériaux et méthodes, les résultats et discussions associées ainsi que les conclusions partielles suivantes :

Le chapitre V, „*Induction de la parodontite dans un modèle expérimental de rat utilisant des bactéries isolées du microbiome oral humain*”, visait à évaluer l'induction de la maladie parodontale dans un modèle de rat utilisant les espèces bactériennes impliquées dans la pathologie de la parodontite humaine.

Nous avons inclus dans l'étude 20 rats Wistar mâles, âgés de 20 semaines, chez lesquels nous avons appliqué des ligatures avec fil de rétraction gingivale sur les incisives supérieures. 5 jours/semaine, 6 semaines, la ligature et le sac gingival ont été contaminés, par gavage, par des souches fraîches d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* et *Streptococcus oralis* à la concentration de 10^9 UFC/mL. Au cours de la période de surveillance clinique, nous avons suivi l'expression des signes cliniques spécifiques de la parodontite, l'évolution du poids corporel et prélevé des échantillons de la cavité buccale pour l'identification microbiologique des bactéries testées et des échantillons de sang pour l'examen hématologique, biochimique et immunologique. Nous avons effectué une analyse radiologique des animaux pour suivre la densité osseuse et à la fin, les rats ont été euthanasiés. Les incisives parodontales échantillonnées ont été analysées histopathologiquement pour confirmer l'induction de la maladie.

La symptomatologie caractéristique de la maladie parodontale s'est exprimée dès la première semaine de l'étude et s'est maintenue jusqu'à la fin, la bactérie ayant pu être identifiée à la fin de l'étude. L'augmentation du nombre de neutrophiles était significative et associée à des lésions parodontales locales. Ces résultats attestent du fait que le processus inflammatoire a été provoqué par une invasion bactérienne et a déclenché la migration des neutrophiles. En outre, l'indice immuno-inflammatoire systémique a montré une réaction inflammatoire prononcée maintenue jusqu'au dernier jour de l'expérience, tout comme l'activité des cytokines pro-inflammatoires. L'examen biochimique a permis de compléter le diagnostic de parodontite grâce à l'augmentation des résultats de paramètres tels que l'ALT et l'ALKP, qui signifient l'initiation du processus de résorption osseuse, étape finale de la maladie. Suite à l'analyse radiologique, nous avons obtenu l'aspect du support osseux, exprimé en plusieurs degrés de densité afin que, dans chacune des images examinées, puissent être observés différents stades de résorption osseuse. La confirmation de l'induction de la maladie parodontale a eu lieu suite à l'examen histopathologique des échantillons de tissus incisifs et parodontaux collectés à la fin de l'expérience. Des constatations telles qu'un infiltrat inflammatoire, des abcès, une nécrose du ligament alvéolo-dentaire, une lyse osseuse, un infiltrat bactérien ou encore une inflammation pyogranulomateuse ont complété le panel d'investigation permettant d'établir avec précision la maladie.

Corroborant les données, nous pouvons conclure que nous avons induit une maladie parodontale en utilisant des souches bactériennes isolées de la cavité buccale humaine, à une concentration de 10^9 UFC/mL chez des rats auxquels nous avons appliqué du fil de ligature sur les incisives supérieures.

Le **chapitre VI** est intitulé „*Induction d'une péri-implantite chez le modèle expérimental de rat par insertion d'implants en titane dans la première molaire maxillaire*” et le but de cette recherche était de développer une péri-implantite chez le modèle de rat par contamination orale avec les mêmes bactéries utilisées pour induction d'une maladie parodontale. L'étude a été réalisée en trois étapes : l'extraction de la première molaire maxillaire pour reproduire la dentition humaine, la pose de l'implant et enfin, la contamination du dispositif par bâillonnement avec *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* et *Streptococcus oralis*, concentration 10^9 UFC/mL, 5 jours/semaine, 6 semaines.

Pour cette expérience, nous avons utilisé 20 rats Wistar mâles pesant 350 à 400 grammes au début de l'étude. L'extraction dentaire nécessitait des approches et des instruments similaires à la technique dentaire humaine, et la période requise pour la régénération de l'alvéole dentaire était de 30 jours. S'ensuit l'implantation du dispositif sur le site édenté à l'aide d'un matériel spécifique et nous avons également prévu un délai de 30 jours pour l'intégration, étape précédée de l'exposition de l'implant à l'action bactérienne et du suivi de l'évolution clinique. L'examen radiologique réalisé après l'extraction, après la pose de l'implant et après la fin de la période de contamination buccale, a permis d'évaluer la densité osseuse, la position ou la perte de l'implant. Les examens hématologiques réalisés au cours de la recherche ont montré des augmentations statistiquement significatives des leucocytes, Hb, RBC, MCH, MCHC et PLT, mais surtout du niveau de neutrophiles et de lymphocytes, et l'indice immuno-inflammatoire systémique a complété le tableau lié à la réponse inflammatoire déclenchée comme résultat de l'activité de micro-organismes pathogènes sur les tissus buccaux.

En examinant le profil hépatique et rénal, nous avons émis l'hypothèse que la péri-implantite est associée à des maladies systémiques, et l'examen histopathologique a montré des lésions péri-implantites caractérisées par un infiltrat inflammatoire marqué avec de nombreux neutrophiles et lymphocytes. La réponse du corps suite au processus de résorption osseuse a émergé des images de réorganisation osseuse complète avec un tissu fibreux abondant et une réaction inflammatoire prononcée autour des séquestrations osseuses. On a également observé la réactivité du tissu gingival, fortement infiltré de cellules de la ligne blanche définissant des phénomènes pyogranulomateux, l'aspect général du bord péri-implantaire étant irrégulier et hyperémique.

En corroborant tous les résultats, nous avons pu développer avec succès un modèle de péri-implantite de rat utilisant une infection bactérienne mixte par la technique du gavage oral, une affirmation étayée par la preuve de la récupération des micro-organismes utilisés, en fin d'étude.

Le **chapitre VII** est intitulé „*Réalisation d'un traitement immunostimulateur à base de lysat bactérien par ultrasonication de souches bactériennes utilisées pour induire des parodontites et des péri-implantites*”. Décrits ici sont les matériaux et les méthodes utilisées pour obtenir des lysats bactériens à partir de souches d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* et *Streptococcus oralis* qui ont induit une maladie parodontale et péri-implantaire dans le modèle de rat. A partir de cultures de 24 heures, nous avons obtenu le produit final, après inactivation et rupture mécanique de la paroi bactérienne. Nous avons vérifié l'effet du lysat bactérien grâce à un test *in vitro* consistant à le mettre en contact avec des bactéries vivantes, dans différentes dilutions. Nous avons imité le traitement en ajoutant quotidiennement une dose de lysat et observé l'inhibition de l'activité bactérienne. A une deuxième dose, au moins le double, les résultats ont montré que le lysat neutralise l'agent microbien présent

dans le milieu liquide. Sur les milieux de culture solides, nous avons pu détecter l'effet inhibiteur après le deuxième ensemencement, c'est-à-dire lorsque la double dose du lysat par rapport aux bactéries vivantes a été retrouvée dans l'inoculum à cultiver.

Grâce à ces résultats, nous avons été encouragés à tester *in vivo* des lysats bactériens, et dans le **chapitre VIII**, que nous avons intitulé „*Évaluation de l'effet de l'antibiothérapie et du traitement par lysat bactérien sur la parodontite et la péri-implantite*”, nous avons comparé la norme thérapeutique actuelle avec la efficacité du produit à base de lysat bactérien.

Il a sélectionné pour l'étude 30 rats Wistar mâles adultes que nous avons répartis en fonction de la maladie induite et du traitement appliqué, ce qui a donné un nombre de 6 groupes : groupe témoin maladie parodontale et groupe témoin péri-implantite, traités avec une solution saline, les groupes atteints de parodontite et de péri-implantite ayant reçu un traitement antibiotique et anti-inflammatoire, et la dernière catégorie s'adressait aux animaux chez lesquels nous avons développé une maladie parodontale, respectivement une péri-implantite, chez lesquels nous avons administré le lysat bactérien. Cette étude complexe a été réalisée sur une période de 113 jours, durant laquelle nous avons analysé les animaux d'un point de vue clinique, hématologique, biochimique, immunologique, radiologique, microbiologique et enfin histopathologique.

Les résultats obtenus ont montré la réduction des signes d'inflammation des tissus autour des dents dans le cas de groupes d'animaux atteints de maladie parodontale traités avec des antibiotiques et également avec du lysat. En lien avec l'évolution de la maladie péri-implantaire, il a été constaté que le taux de survie des implants était plus élevé dans le groupe ayant reçu un lysat bactérien. L'examen hématologique a révélé une diminution des globules blancs, notamment chez les animaux traités avec des antibiotiques et des anti-inflammatoires, et les péri-implantites soumises au lysat bactérien ont maintenu un indice immuno-inflammatoire systémique élevé jusqu'à la fin de l'étude. Sur le plan biochimique, après la mise en place des schémas thérapeutiques, nous n'avons pas observé d'influence réfléchie sur les fonctions des organes vitaux. L'examen immunologique a accordé plus d'attention à la fonction biologique de l'IL-6 et a analysé sa relation avec la destruction des tissus au niveau du site parodontal ou péri-implantaire par rapport à l'IL-1 et au TNF- α . L'IL-6, suite à l'application des traitements, a joué un rôle protecteur, son taux restant élevé dans les groupes traités par parodontite et péri-implantite, démontrant l'efficacité similaire des deux traitements. Du point de vue histopathologique, les lésions détectées ont confirmé l'atténuation du processus inflammatoire dans les tissus parodontaux et dans le sac péri-implantaire, de même pour les maladies parodontales et péri-implantaires, quel que soit le traitement appliqué. Uniquement dans le cas de péri-implantite traitée avec des antibiotiques, l'infiltrat inflammatoire est resté élevé dans les échantillons analysés.

En corroborant les résultats finaux, nous avons pu conclure que le traitement par lysat bactérien a eu un effet similaire au traitement standard de la maladie parodontale transposé à la péri-implantite. Cette option thérapeutique peut être valable en cas de parodontite ou de péri-implantite développée sous l'action de bactéries pathogènes, et une thérapie personnalisée à base de lysat bactérien pourrait réduire la consommation inutile d'antibiotiques.

La nouveauté de la thèse de doctorat réside dans la possibilité de traiter aussi bien la parodontite que la péri-implantite avec des lysats bactériens. Si la littérature spécialisée mentionne certains résultats obtenus suite à l'administration de produits commerciaux établis basés sur la lyse bactérienne, je n'ai jamais rencontré de protocole décrit utilisant les bactéries responsables du déclenchement des maladies parodontales et péri-implantaires, pour créer un traitement pour remédier aux conditions. Les études publiées jusqu'à présent n'abordent que les maladies parodontales, et grâce à nos études, nous avons pu démontrer l'efficacité du lysat bactérien y compris sur les péri-implantites. Un autre élément de nouveauté du travail était l'indice immuno-inflammatoire systémique appliqué à la fois à la parodontite et à la péri-implantite. Actuellement, aucune étude n'a inclus ce paramètre dans l'analyse des deux maladies, bien qu'il puisse être facilement calculé sur la base des données fournies par l'examen hématologique, étant un bon prédicteur de l'inflammation des tissus buccaux. Enfin, nous rendons hommage aux animaux dont l'implication dans la recherche est d'une grande importance pour l'évolution scientifique. Nos études, utilisant un modèle de rat, ont démontré la possibilité de développer une maladie parodontale et une péri-implantite en contaminant la cavité buccale avec un mélange bactérien sélectionné chez des patients humains, aucune autre étude ne rapportant l'induction de pathologies avec des souches *d'Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* et *Streptococcus oralis* inoculé simultanément.

Au **chapitre IX**, j'ai inclus les conclusions générales liées aux quatre études expérimentales ainsi que les recommandations visant à améliorer les protocoles thérapeutiques de la maladie parodontale et de la péri-implantation.

L'étude bibliographique a inclus 412 références, et dans leur grande majorité elles sont représentées par des publications des 10 dernières années.

Le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les maladies parodontales et les péri-implantites est aujourd'hui une préoccupation majeure du monde médical, chaque année, les chercheurs en parodontologie et implantologie réalisent de nombreuses études qui contribuent à l'actualisation des informations actuelles. Le succès thérapeutique de la parodontite ne peut pas être entièrement transféré à la péri-implantite et, par conséquent, de nouveaux protocoles sont nécessaires pour agir efficacement dans les deux cas, d'autant plus que l'incidence et la coexistence de ces maladies ont tendance à augmenter chez les patients humains.

Les études présentées dans cette thèse de doctorat visent à apporter les vastes connaissances qui caractérisent la maladie parodontale et la péri-implantite. Parallèlement, les résultats de la recherche contribuent au développement de nouveaux traitements pour la prévention et la guérison de ces deux maladies.

