

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

Année 2021

N° 11

THESE

Présentée pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire
le 21/01/2021

par

JAFARI Amine

né le 17/08/1993 à LUXEUIL-LES-BAINS

RÔLE DES MICRO-ARN DANS L'HOMÉOSTASIE PARODONTALE ET APPLICATIONS
CLINIQUES : UNE REVUE DE LA LITTÉRATURE

Président : Professeur HUCK Olivier
Assesseurs : Professeur DAVIDEAU Jean-Luc
Docteur JUNG Sophie
Docteur BOEHLER Christian

FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE DE STRASBOURG

Doyen : Professeur Corinne TADDEI-GROSS

Doyens honoraires : Professeur Robert FRANK

Professeur Maurice LEIZE

Professeur Youssef HAIKEL

Professeurs émérites : Professeur Henri TENENBAUM

Responsable des Services Administratifs : Mme Françoise DITZ-MOUGEL

Professeurs des Universités

Vincent BALL	Ingénierie Chimique, Energétique - Génie des Procédés
Agnès BLOCH-ZUPAN	Sciences Biologiques
François CLAUSS	Odontologie Pédiatrique
Jean-Luc DAVIDEAU	Parodontologie
Youssef HAÏKEL	Odontologie Conservatrice - Endodontie
Olivier HUCK	Parodontologie
Marie-Cécile MANIERE	Odontologie Pédiatrique
Florent MEYER	Sciences Biologiques
Maryline MINOUX	Odontologie Conservatrice - Endodontie
Anne-Marie MUSSET	Prévention - Epidémiologie - Economie de la Santé - Odontologie Légale
Corinne TADDEI-GROSS	Prothèses
Béatrice WALTER	Prothèses
Matthieu SCHMITTBUHL	Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques - Biomatériaux - Biophysique - Radiologie
<i>Délégation (Juin 2024)</i>	

Maîtres de Conférences

Youri ARNTZ	Biophysique moléculaire
Sophie BAHY-GROSS	Chirurgie Buccale - Pathologie et Thérapeutique - Anesthésiologie et Réanimation
Yves BOLENDER	Orthopédie Dento-Faciale
Fabien BORNERT	Chirurgie Buccale - Pathologie et Thérapeutique - Anesthésiologie et Réanimation
Abdessamad BOUKARI	Chirurgie Buccale - Pathologie et Thérapeutique - Anesthésiologie et Réanimation
Claire EHLINGER	Odontologie Conservatrice - Endodontie
Olivier ETIENNE	Prothèses
Florence FIORETTI	Odontologie Conservatrice - Endodontie
Catherine-Isabelle GROS	Sciences Anatomiques et Physiologiques - Biophysique - Radiologie
Sophie JUNG	Sciences Biologiques
Nadia LADHARI	Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques - Biomatériaux - Biophysique
<i>Disponibilité (Nov. 2020)</i>	
Davide MANCINO	Odontologie Conservatrice - Endodontie
Damien OFFNER	Prévention - Epidémiologie - Economie de la Santé - Odontologie Légale
Catherine PETIT	Parodontologie
François REITZER	Odontologie Conservatrice - Endodontie
Martine SOELL	Parodontologie
Marion STRUB	Odontologie Pédiatrique
Xavier VAN BELLINGHEN	Prothèses
Delphine WAGNER	Orthopédie Dento-Faciale
<i>Délégation (Août 2021)</i>	
Etienne WALTMANN	Prothèses

Equipes de Recherche

Nadia JESSEL	INSERM / Directeur de Recherche/Directrice d'UMR
Philippe LAVALLE	INSERM / Directeur de Recherche
Pierre SCHAAF	UNISTRA / Professeur des Universités / Directeur d'UMR
Bernard SENGER	INSERM / Directeur de Recherche

À Monsieur le Professeur **Olivier HUCK**,

Vous me faites le double honneur de présider ce jury et de diriger cette thèse. Je tiens à vous remercier particulièrement pour votre pédagogie, votre réactivité, votre dynamisme ainsi que votre bonne humeur et votre sens de l'humour. Je vous souhaite une excellente continuation dans la suite de votre carrière universitaire. Permettez-moi de vous exprimer, ici, toute ma considération et mon profond respect.

À monsieur le Professeur **Jean-Luc DAVIDEAU**,

Vous avez spontanément accepté d'intégrer ce jury et d'évaluer ce travail. Je tenais à vous remercier personnellement pour ces trois années de clinique et plus particulièrement pour les connaissances que vous m'avez transmises lors de l'enseignement complémentaire de parodontologie durant ma dernière année de clinique. Cette dernière année a définitivement été la plus riche sur l'apprentissage de la parodontologie ; elle m'a permis de développer mon attrait pour cette discipline, de retranscrire mes acquis dans ma pratique actuelle et surtout de continuer à étoffer et perfectionner mes connaissances.

À madame le Docteur **Sophie JUNG**,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie des membres de ce jury. Le sujet m'a immédiatement fait penser à vous pour constituer ce jury, j'espère que trouverez dans ce travail des informations intéressantes en rapport avec vos thématiques de recherche. J'ai apprécié faire partie de votre vacation de pédodontie, pour votre délicatesse et votre gentillesse.

Au Docteur **Christian BOEHLER**,

Je te remercie d'avoir accepté d'intégrer ce jury. Je retiens nos années communes en tant qu'étudiants mais je retiens aussi ma dernière année de clinique au service d'OCE où tu as été un encadrant disponible et agréable ; j'en garderai un très bon souvenir.

Au Docteur **Thomas MARCOT**,

Je te remercie d'avoir accepté d'initier la direction de cette thèse. Je garderai un agréable souvenir de mes deux dernières années de clinique sous ton encadrement. Je te souhaite une excellente continuation dans la suite de ta vie professionnelle et personnelle.

À **Justine et Laëtitia**, je vous remercie de m'avoir fait confiance en m'ouvrant les portes de votre cabinet et de m'avoir offert des conditions de travail qui me permettent de m'épanouir dans mon début exercice. Merci pour votre présence, pour votre gentillesse et surtout merci pour toutes ces digues.

À **Alicia**, merci pour tes conseils quand je te sollicite, ta sympathie et ta bonne humeur. Je te souhaite une belle réussite dans ta nouvelle aventure professionnelle.

Aux assistantes, **Catherine, Corinne et Michèle**, pour votre gentillesse, votre bonne humeur, votre travail, merci (et merci de ranger chaque matin le matos de mes sessions nocturnes de la veille).

À **Guillaume**, mon maître de stage, je n'oublie pas que je suis venu te voir à la fin de ma P1, hésitant entre médecine et dentaire. Merci de ne pas avoir hésité à m'orienter dans mon choix.

À **mes parents**, sans qui l'aboutissement de mes études ne serait pas et grâce à qui le mot dévouement prend tout son sens. Cette réussite est avant tout la vôtre et vous remercier ne suffit pas.

À **mes frères et sœur**, je vous remercie pour le soutien que vous m'avez apporté chacun à votre façon depuis tout petit et jusqu'à ce jour.

À mes deux chers potes du lycée, **Victor et Younes**, merci d'être les amis que vous êtes depuis douze années déjà. Sachez que vous occupez tous les deux une place très spéciale dans mon cœur. Les années passent, les cheveux tombent, mais les amitiés restent.

À **Thomas et Quentin**. Désolé d'avoir changé mes vœux au dernier moment pour devenir dentiste plutôt que de devenir un confrère médecin. Je suis heureux de constater qu'aujourd'hui nous restons les mêmes amis qu'en P1.

Aux **Babtous** : Alex, Corentin, Cyrille, Igor et Marwane. Que dire si ce n'est que ces années de fac n'auraient absolument pas eu la même saveur sans vous.

À la team restreinte **Exodia les Maudits** : Igor et Marwane. J'espère qu'on trouvera un jour un remède contre la périgorite et contre l'aboudiabyte chronique.

À **Gautier et Jordan**, merci pour notre amitié qui nous tire constamment vers le haut.

Aux **deux Nicolas** et à notre « coloc de l'ambiance ». Aujourd'hui encore je me remémore les deux années de colocation que nous avons passées ensemble. Les derniers moments d'insouciance avant de grandir un peu étaient avec vous.

À **Johan**, mon éternel numéro 10.

À **Enrique**, mon premier pote de la fac, rencontré avant la rentrée, pendant le stage infirmier.

À **Claude et Carmen**, merci pour toute la vitamine C prodiguée qui m'a permis de tenir pour la fin de la rédaction de cette thèse.

À **Pauline**, merci pour ton soutien indéfectible et ta présence inconditionnelle. Ça y est : « Petit gland est devenu grand chêne ».

À mon **Macbook**, dans ta 10^{ème} année et toujours fidèle au poste. Encore un diaporama à tenir et tu peux rendre l'âme quand tu veux et sans rancune poto.

À **Gus**.

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

Année 2021

N° 11

THESE

Présentée pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire
le 21/01/2021

par

JAFARI Amine

né le 17/08/1993 à LUXEUIL-LES-BAINS

RÔLE DES MICRO-ARN DANS L'HOMÉOSTASIE PARODONTALE ET APPLICATIONS
CLINIQUES : UNE REVUE DE LA LITTÉRATURE

Président : Professeur HUCK Olivier
Assesseurs : Professeur DAVIDEAU Jean-Luc
Docteur JUNG Sophie
Docteur BOEHLER Christian

Table des matières

Introduction	8
Partie I : physiopathologie des maladies parodontales.....	10
1. Introduction.....	10
a. Étiopathogénie	10
b. L'homéostasie parodontale	10
2. Le biofilm parodontal	11
a. Les biofilms oraux	11
b. Les bactéries de la cavité orale.....	15
3. La réponse de l'hôte.....	18
a. Les acteurs de la réponse innée	18
b. Les acteurs de la réponse adaptative.....	21
c. La régulation de la réponse immunitaire	23
d. La réaction inflammatoire parodontale	23
4. Atteintes tissulaires.....	24
a. Aspects histopathologiques et anatomopathologiques	24
b. La destruction tissulaire	28
Partie II : Généralités sur les micro-ARN	32
1. Rappels et définitions sur l'expression génique : transcription, traduction et régulation post-transcriptionnelle.....	32
2. Définition des micro-ARN	32
3. Historique sur les micro-ARN	33
a. L'interférence	33
b. Découverte des micro-ARN	33
4. Biogenèse (voie canonique)	34
5. Nomenclature.....	36
6. Mécanismes d'action.....	37
a. Principes de l'interaction entre micro-ARN et ARNm.....	37
b. Mécanismes de régulation post-transcriptionnelle par les micro-ARN.....	37
c. Complexité de la régulation des micro-ARN	39
7. Fonctions biologiques et physiologiques.....	39
a. Principes de mise en évidence de l'importance des micro-ARN dans les organismes.....	39
b. Le cycle cellulaire	39
c. Signalisation cellulaire	40
d. Le système immunitaire.....	40
8. Implications physiopathologiques	42
a. Rôle potentiel des micro-ARN dans les maladies systémiques.....	42
b. Réponse aux agressions bactériennes	43

c. Maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes	43
Partie III : les micro-ARN dans la maladie parodontale	45
1. Les micro-ARN d'intérêt en parodontologie	45
a. La réponse immunitaire	46
b. Le métabolisme osseux	47
c. La réponse à <i>Porphyromonas gingivalis</i>	49
2. Le micro-ARN : un outil diagnostique ?	50
a. Détection des micro-ARN	50
b. Les biomarqueurs en parodontologie	52
3. Le micro-ARN : un outil thérapeutique ?	57
a. Thérapie de suppression	58
b. Thérapie de remplacement	59
c. Modulation de l'inflammation et de la résorption osseuse par injection de mime-miR-155 et d'anti-miR-2137	61
4. Discussion	63
a. Les micro-ARN comme nouveaux biomarqueurs	63
b. Les micro-ARN comme thérapie novatrice	72
c. Quelle place et quel intérêt des micro-ARN dans la pratique de la parodontologie ?	73
Conclusions.....	74
Références bibliographiques	77

Table des illustrations

Figure 1 : Mécanismes pathogéniques associés à la rupture de l'homéostasie parodontale	11
Figure 2 : Chronologie de la formation du biofilm parodontal	14
Figure 3 : Les complexes bactériens de la classification de Socransky	17
Figure 4 : Les récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR)	20
Figure 5 : La lésion initiale.....	25
Figure 6 : La lésion précoce	26
Figure 7 : La lésion établie	27
Figure 8 : La lésion avancée	27
Figure 9 : Les médiateurs inflammatoires impliqués dans la résorption tissulaire des tissus parodontaux	30
Figure 10 : Biogenèse des micro-ARN	35
Figure 11 : Mécanismes d'action des micro-ARN.....	38
Figure 12 : Les micro-ARN impliqués dans le développement et la différenciation des cellules immunitaires	41
Figure 13 : Le rôle des micro-ARN dans la régulation de l'ostéoblastogénèse	48
Figure 14 : Le rôle des micro-ARN dans la régulation de l'ostéoclastogénèse	49
Figure 15 : Modes de sécrétions des micro-ARN circulants.....	51
Figure 16 : Liste des micro-ARN sélectionnés chez l'Homme pour la méta-analyse du niveau d'expression relatif chez les sujets atteints de parodontite en comparaison avec les sujets sains. Valeur-p < 0,05	55
Figure 17 : Mécanisme d'action de miR-146a dans la voie NF-kB dépendante de TLR4	56
Figure 18-a : Les thérapies de suppressions	58
Figure 19-a : Les thérapies de remplacement.....	60
Figure 20 : Expression de TNF- α et IL-10 dans des macrophages murins exposés à <i>Porphyromonas gingivalis</i> suite à l'injection d'anti-miR et des miR-mimes	62
Figure 21 : Analyse de l'évolution des lésions et de l'inflammation basée sur les observations histologiques	63

Tableau 1 : Les biomarqueurs actuels en parodontologie.....	53
Tableau 2 : Avantages et inconvénients des méthodes de détection des micro-ARN	67
Tableau 3 : Les micro-ARN d'intérêt en tant que potentiels biomarqueurs	70

Liste des abréviations

Ag : antigène

Ago : argonaute

ARNm : acide ribonucléique messager

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ARNt : acide ribonucléique de transfert

CD4 : cluster de différenciation 4

CD8 : cluster de différenciation 8

CDK : cyclin-dependant kinase

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CRP : C-reactive protein

DGCR8 : DiGeorge syndrome chromosomal region 8

E2F : E2 transcription factor

GW182 : glycine-tryptophan 182

HDL : high density lipoprotein

ICTP : collagen type I C-terminal telopeptide

IFN : interféron

IL- : interleukine-

IRAK : interleukin-1 receptor-associated kinase-1

LDL : low density lipoprotein

LPS : lipopolysaccharide

LT : lymphocyte T

LT Th : lymphocyte T helper

LTreg : lymphocyte T régulateur

MAPK : mitogen activated protein kinase

miR : micro-ARN

MMP : métalloprotéase matricielle

NF-kB : nuclear factor-kappa B

NGS : next-generation sequencing

NOD : nucleotid-binding oligomerization domain

OPG : ostéoprotégérine

p-body : processing body
PACT : protein activator of the interferon-induced protein kinase
PAMP : pathogen-associated molecule pattern
PGE2 : prostaglandine E2
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PNN : polymorphonucéaire neutrophile
PRR : pattern recognition receptor
RANK : receptor activator of nuclear factor kappa B
RANK-L : receptor activator of nuclear factor kappa B-ligand
RISC : RNA-induced silencing complex
RNase : ribonucléase
RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction
SOCS : suppressor of cytokine signaling
SP-D : surfactant protein-D
TBRP : trans-activation response RNA binding protein
TCR : T cell receptor
TGF- β : transforming growth-factor β
TLR : toll-like receptor
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
TRAF6 : tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
UTR : untranslated region
XRN1 : exoribonuclease 1

Introduction

Le parodonte est composé de structures tissulaires permettant l'ancrage de la dent dans l'os maxillaire. Les tissus de soutien de la dent se distinguent en tissus mous et tissus durs : la gencive, l'os alvéolaire, le ligament alvéolo-dentaire et le ciment. La gencive constitue le parodonte superficiel et se compose d'un épithélium et d'un tissu conjonctif qui forment un système d'attache superficiel. L'os alvéolaire, le ligament alvéolo-dentaire et le ciment forment un système d'ancrage profond.

La maladie parodontale se définit comme une affection des tissus de soutien de la dent, d'origine microbienne associée à des lésions inflammatoires. Elle résulte d'un déséquilibre entre la réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte et les bactéries des biofilms oraux. La maladie parodontale engage de nombreux mécanismes biomoléculaires et cellulaires rendant sa physiopathologie très complexe.

Actuellement, le diagnostic des parodontites repose essentiellement sur l'examen clinique et les examens radiographiques. L'examen clinique consiste en l'évaluation du niveau d'attache et de la profondeur des poches par la réalisation d'un sondage parodontal, ainsi qu'en l'appréciation de l'état inflammatoire du parodonte par l'évaluation du saignement au sondage et l'examen visuel du parodonte superficiel. Il se complète d'examens radiographiques en deux dimensions (orthopantomogramme et radiographies rétro-alvéolaires) permettant d'apprécier le niveau osseux de façon générale mais aussi plus localement. Le diagnostic de la maladie parodontale basé sur le sondage et les examens radiographiques permet uniquement d'évaluer l'étendue de la maladie (localisée ou généralisée) et sa sévérité. Ainsi ces outils diagnostiques présentent des limites. En effet, ils ne permettent pas de mettre en évidence l'activité et le pronostic de la maladie, qui sont des éléments qui permettraient d'adapter les décisions et les stratégies thérapeutiques. De nombreux tests ont vu le jour afin de répondre à ces limites. Les tests bactériologiques, visant à identifier les bactéries parodontopathogènes, présentent un intérêt clinique limité. D'autres tests sur les marqueurs biologiques sont également apparus ; néanmoins aucun de ces tests n'a permis d'identifier un marqueur ou un ensemble de marqueurs satisfaisant. Récemment de nouvelles molécules ont été étudiées : les micro-ARN. Les micro-ARN sont de courtes molécules d'acide ribonucléique non codantes constituées d'une vingtaine de nucléotides, intervenant dans la régulation de l'expression génique post-

transcriptionnelle. De nombreux micro-ARN ont été identifiés comme prenant part à la régulation de plusieurs processus et fonctions physiologiques dont la fonction immunitaire, la réponse inflammatoire et le métabolisme tissulaire. Ainsi, les micro-ARN auraient également un rôle à jouer dans l'homéostasie des tissus parodontaux. Ces petites molécules occupent aujourd'hui une place importante dans la recherche pour plusieurs maladies et notamment les maladies inflammatoires chroniques et les maladies à composante immunitaire. Dans la mesure où la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire jouent un rôle majeur dans les maladies parodontales, l'investigation autour de ces molécules permettrait de mieux comprendre la complexité de sa physiopathologie.

Par ailleurs, parmi les micro-ARN étudiés, certains pourraient présenter un intérêt en tant que biomarqueurs permettant de préciser le diagnostic des maladies parodontales, d'évaluer leur activité, de déterminer leur susceptibilité d'évolution ou encore d'établir un pronostic plus précis. En parallèle, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont en cours de développement autour des micro-ARN dans d'autres disciplines médicales et dont les résultats pourraient bénéficier à la parodontologie.

Partie I : physiopathologie des maladies parodontales

1. Introduction

a. Étiopathogénie

Le concept actuel définit la maladie parodontale comme une pathologie multifactorielle qui associe :

- La présence de bactéries au niveau des surfaces dentaires et gingivales,
- La présence de facteurs de risques émanant des facteurs environnementaux et des particularités génétiques de l'hôte, le rendant susceptible à la maladie parodontale.

Les bactéries parodontopathogènes ont la capacité d'agir sur la réponse immunitaire de l'hôte en provoquant une réponse inflammatoire excessive pouvant entraîner la destruction des tissus parodontaux. Les facteurs de risques chez l'hôte peuvent moduler et influencer l'activité et la sévérité des atteintes tissulaires (1).

b. L'homéostasie parodontale

L'homéostasie parodontale est un état d'équilibre existant entre l'hôte et la flore buccale. Elle se traduit par la capacité des tissus parodontaux à se maintenir dans un état d'équilibre physiologique en s'adaptant aux contraintes extérieures que sont notamment les facteurs de risques et les différentes populations constituant la flore bactérienne. Le système immunitaire de l'hôte est le métronome de cet équilibre : il doit permettre la coexistence de ces deux composantes.

La maladie apparaît lorsque le système immunitaire est dépassé par les contraintes extérieures et ne parvient alors plus à assurer l'homéostasie tissulaire (figure 1).

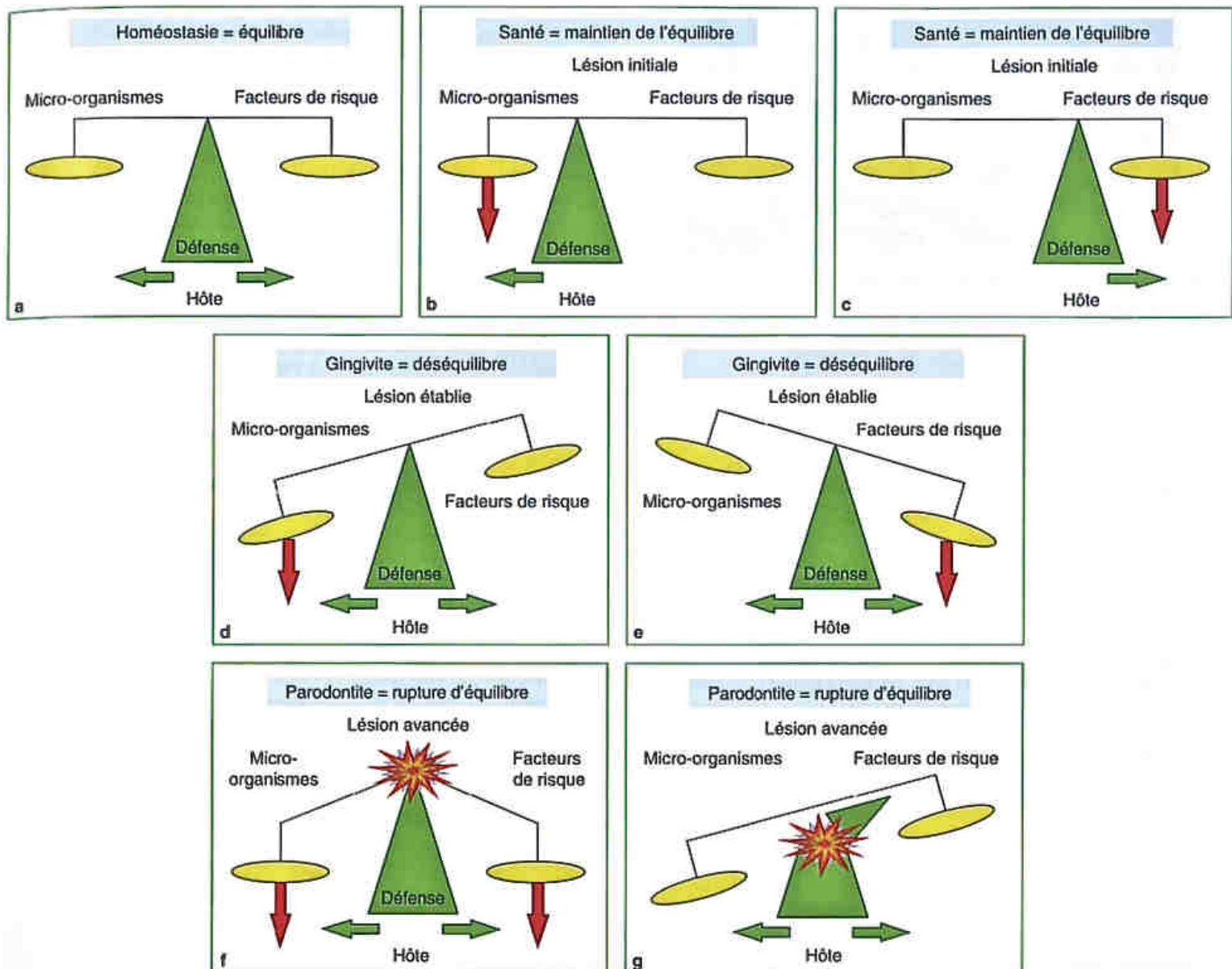


Figure 1 : Mécanismes pathogéniques associés à la rupture de l'homéostasie parodontale (2)

2. Le biofilm parodontal

a. Les biofilms oraux

Les biofilms oraux se définissent comme une communauté polymicrobienne, adhérente aux surfaces dentaires et enrobée dans une matrice inter-cellulaire de polymères issus des bactéries et de l'hôte. Il s'agit d'un biofilm structuellement et fonctionnellement bien organisé (2). La composition bactérienne du biofilm variera

selon sa localisation (supra- ou sous-gingivale) et est influencée par l'hygiène du patient et les différents facteurs de risque qui lui sont associés (génétique, tabac, stress, pathologies systémiques, etc.) (1).

i. Formation et dynamique

Les biofilms oraux se forment initialement par l'adhésion des bactéries à la surface de la dent (3).

Les biofilms oraux se forment en quatre étapes principales (figure 2) :

- agrégation des bactéries à la surface dentaire,
- co-adhérence et co-agrégation bactériennes,
- maturation,
- détachement.

La formation des biofilms oraux implique l'interaction des bactéries de la cavité orale avec la pellicule exogène acquise. La pellicule exogène acquise se compose de protéines, de peptides et d'autres molécules issues de la salive et du fluide gingival (4) qui se fixent spontanément aux cristaux d'hydroxyapatite exposés sur la surface dentaire (5). Certains de ces peptides et protéines comportent des motifs qui peuvent être reconnus spécifiquement par les bactéries (6).

Initialement, les bactéries de la cavité buccale, transportées par le flux salivaire et le flux de fluide gingival, s'adsorbent sur la surface dentaire par des liaisons physico-chimiques de faible intensité, non spécifiques, avec la pellicule exogène acquise. Cette liaison des bactéries à la surface dentaire est alors réversible. Cette phase constitue le premier temps de l'agrégation bactérienne sur la surface dentaire. Dans un second temps, les bactéries vont interagir avec la pellicule exogène acquise par des liaisons physico-chimiques fortes : des liaisons ioniques ou des liaisons covalentes, soit en reconnaissant spécifiquement des motifs peptidiques soit par des liaisons non sélectives (5) (7). La liaison est alors irréversible. Ces bactéries initiant la formation du biofilm sont appelées bactéries pionnières ; la majorité de ces bactéries est représentée par des streptocoques et sont principalement Gram+ (8) (9).

Aux bactéries adhérentes à la surface dentaire viennent adhérer d'autres bactéries dont certaines d'entre elles sont incapables d'adhérer directement à la pellicule exogène acquise : on parle de co-adhérence (10). En parallèle, les phénomènes de co-agrégation bactérienne jouent un rôle tout aussi important dans le développement du biofilm (11) (12). Par ces phénomènes de co-agrégation et de co-adhésion, des bactéries secondaires et des bactéries tardives viennent peupler le biofilm existant. Ainsi progressivement, les bactéries s'organisent en colonies sur la surface dentaire.

Les bactéries ayant adhéré de façon stable à la surface dentaire établissent leur croissance et leur nombre par division cellulaire ce qui permet l'accroissement continu des colonies. Les bactéries sécrètent une matrice à la surface des colonies permettant leur protection vis-à-vis des agressions extérieures mais permettant aussi la capture et la rétention de nutriments issus de la salive et du fluide gingival (13). Le métabolisme des bactéries pionnières permet l'élaboration d'un environnement de plus en plus anaérobie et favorable au développement des bactéries tardives à Gram- (14).

Lorsque les biofilms oraux sont épais et consistants, ils sont susceptibles de subir des phénomènes de détachement passif du fait de forces de cisaillement (liées aux fonctions manducatrices) ou de détachement actif du fait de bactéries capables d'hydrolyser leurs liaisons. Suite à ces détachements, les bactéries se retrouvent à nouveau à l'état planctonique et peuvent coloniser d'autres sites selon les mêmes mécanismes.

En finalité, la population bactérienne des biofilms oraux est très hétérogène mais repose sur la communication et la coopération d'espèces bactériennes s'organisant en un biofilm complexe de sorte à optimiser leur développement (14). Les bactéries coopèrent entre elles : en effet, plusieurs vagues de bactéries se succèdent. Des bactéries pionnières colonisent les surfaces et préparent un micro-environnement propice au développement d'espèces bactériennes plus tardives (15).

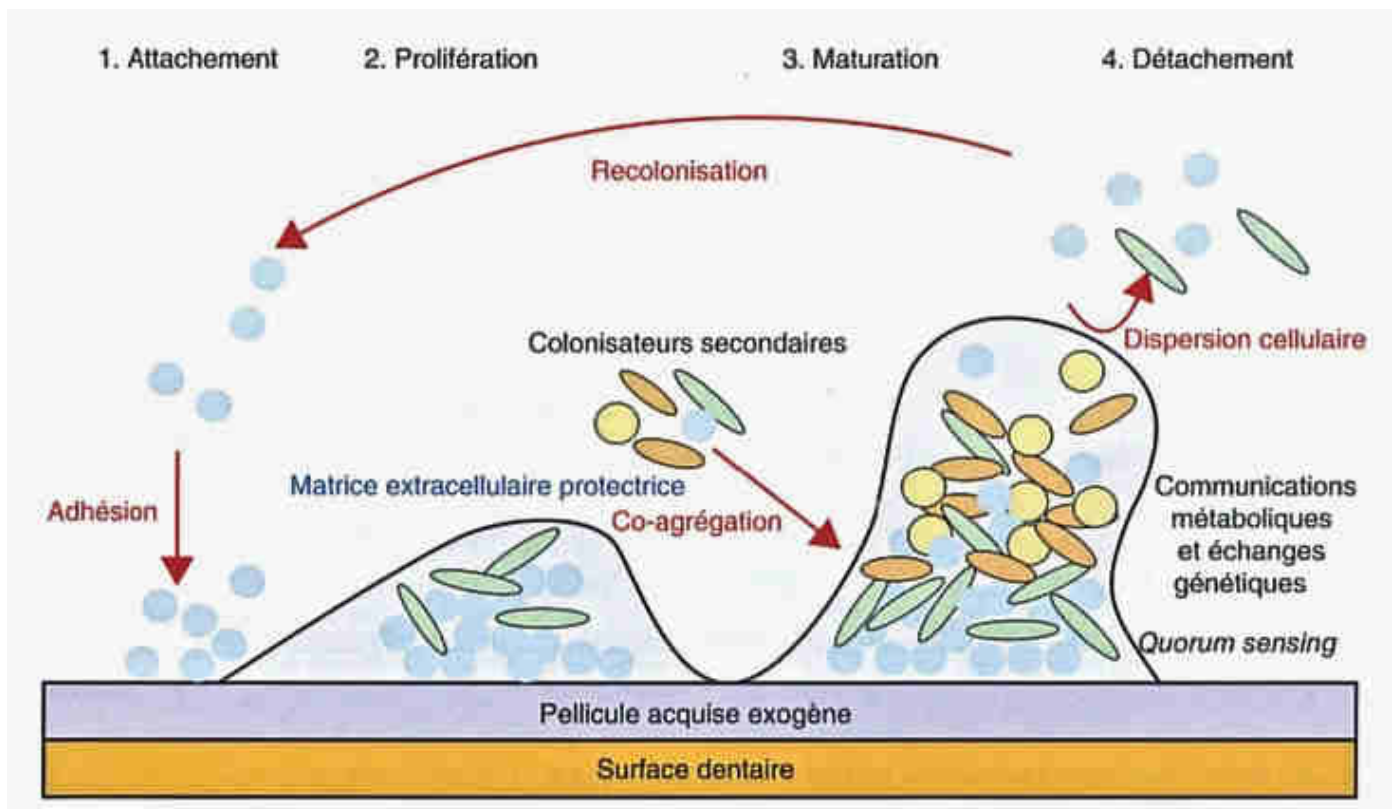


Figure 2 : Chronologie de la formation du biofilm parodontal (2)

ii. Organisation et composition

Les biofilms oraux se subdivisent en un biofilm supra-gingival et un biofilm sous-gingival. Chacun de ces deux types de biofilms possède un environnement particulier. Le biofilm supra-gingival baigne dans la salive, il est surtout aérobie et se compose principalement de bactéries Gram+.

Le biofilm sous-gingival baigne dans le fluide gingival, il est à forte tendance anaérobie, plus favorable à la croissance des bactéries Gram-. On y retrouve des bactéries Gram- essentiellement du côté des surfaces gingivales tandis qu'on retrouve surtout des bactéries Gram+ du côté des surfaces dentaires.

On retrouve par ailleurs des populations bactériennes plus importantes dans le biofilm supra-gingival que dans le biofilm sous-gingival en raison de la différence de surface colonisable. Cependant, les populations bactériennes des différentes espèces semblent similaires en proportions (15).

b. Les bactéries de la cavité orale

i. Composition bactérienne

La cavité buccale contient plusieurs centaines de bactéries (16). Elles puisent leurs nutriments à partir du fluide gingival et de la salive. Les bactéries s'organisent en biofilms et coopèrent entre elles. Elles modulent leurs populations par des mécanismes de régulation inter-espèces basés sur le « *quorum sensing* ».

ii. Les bactéries parodontopathogènes

Socransky introduit en 1977 le concept des bactéries parodontopathogènes. Ce sont des bactéries :

- présentes en grandes quantités dans les sites atteints,
- entraînant une réponse immunitaire chez l'hôte,
- produisant des facteurs de virulence,
- induisant des lésions dans un modèle animal,
- et dont l'élimination s'accompagne d'une amélioration de l'état clinique.

Dans les gingivites et dans les parodontites, on retrouve une augmentation des populations bactériennes mais surtout de populations bactériennes spécifiques.

Dans les gingivites, les phénomènes de successions microbiennes aboutissent à la colonisation tardive par des bactéries parodontopathogènes.

Dans les parodontites, les bactéries *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Prevotella Intermedia* sont prépondérantes dans les sites atteints (17) (18). Ces bactéries, en plus de leur pouvoir de développement et de colonisation, ont la propriété de pouvoir contourner les mécanismes de défense de l'hôte et d'induire directement et indirectement (essentiellement) une destruction tissulaire par leurs facteurs de virulence (18) (19) (20).

Les maladies parodontales sont des maladies multi-bactériennes avec des

populations variables d'un individu à l'autre (21). Cependant, les mêmes bactéries sont souvent retrouvées associées d'un sujet atteint à l'autre entraînant l'apparition du concept de complexes bactériens.

iii. Classification des bactéries parodontopathogènes

Socransky et al. décrivent à la fin des années 90 (22) la tendance des bactéries à s'organiser en clusters. Ils classent les bactéries selon leur pouvoir parodontopathogène et leur localisation dans les situations pathologiques. Ils décrivent six complexes : le complexe rouge, le complexe orange, le complexe jaune, le complexe vert, le complexe violet et le complexe bleu.

Les bactéries des complexes violet, vert et jaune semblent être compatibles avec la santé parodontale mais certaines espèces retrouvées dans ces complexes sont à l'origine de la colonisation initiale.

La présence de bactéries du complexe rouge est retrouvée en plus grand nombre dans les poches parodontales et est donc associée aux parodontites.

Les bactéries du complexe rouge sont très rarement retrouvées chez les patients atteints de parodontite sans la présence de bactéries du complexe orange. Le développement des populations bactériennes du complexe rouge semble donc être dépendant du développement des bactéries du complexe orange.

En résumé :

- Les complexes orange et rouge sont directement associés aux maladies parodontales
- Les autres complexes sont soit associés à des inflammations superficielles du parodonte, soit nécessaires au développement des complexes orange et rouge.

La figure 3, ci-dessous, illustre la classification de Socransky.

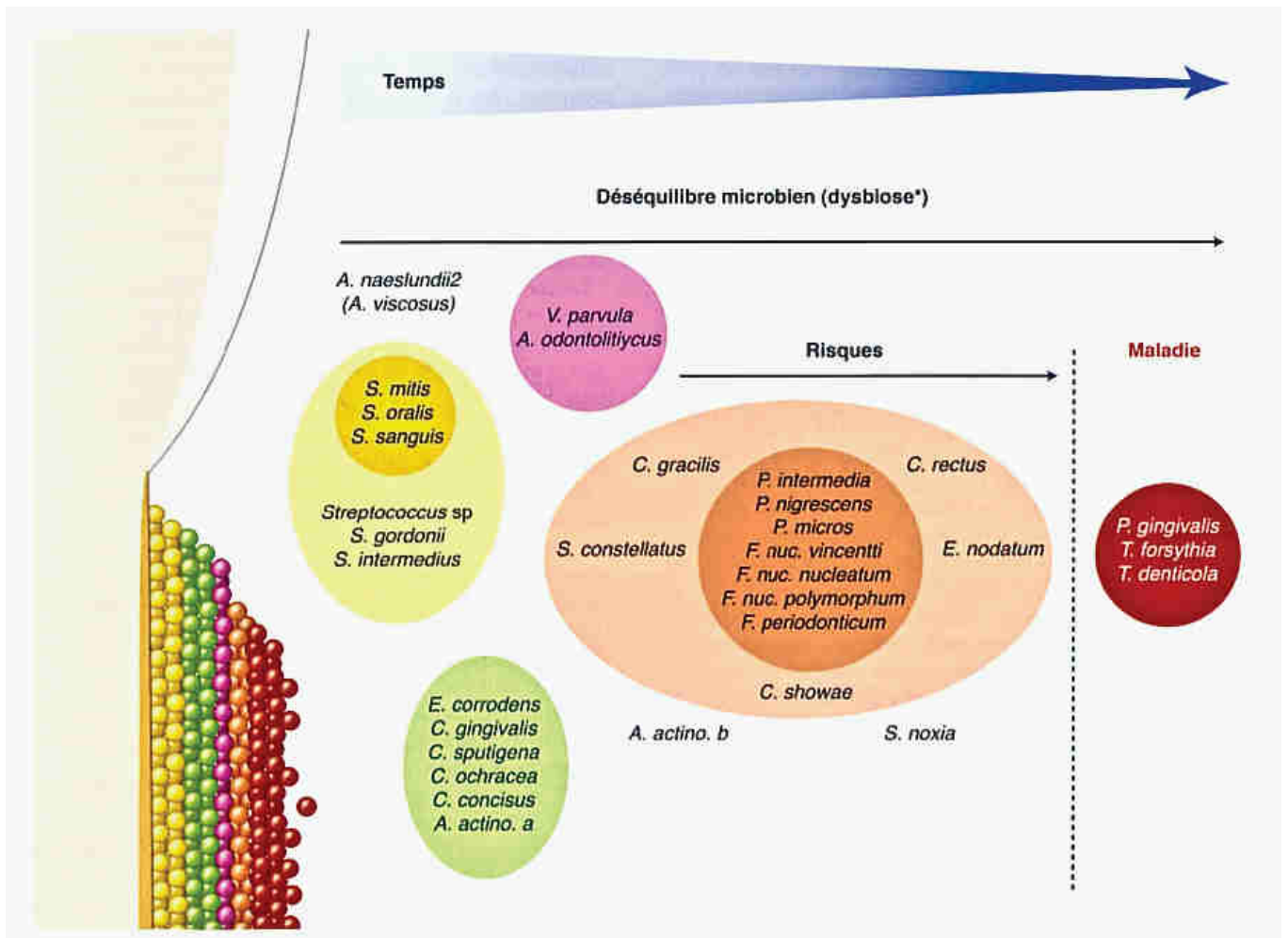


Figure 3 : Les complexes bactériens de la classification de Socransky (2)

iv. Implication dans la destruction tissulaire

Les bactéries parodontopathogènes sont à même de provoquer la destruction tissulaire : soit directement par la libération d'enzymes, soit indirectement par le déclenchement d'une réaction inflammatoire chez l'hôte. En effet, certains constituants bactériens, tels que LPS, peuvent déclencher une réaction inflammatoire en activant les cellules épithéliales qui libèrent des médiateurs chimiotactiques qui attirent des cellules impliquées dans l'immunité et l'inflammation. La réaction inflammatoire a pour conséquence la destruction des tissus de soutien de l'hôte (14).

3. La réponse de l'hôte (14) (23)

La réponse de l'hôte face à l'agression bactérienne consiste en une réponse immunitaire accompagnée d'une réaction inflammatoire visant à réduire la charge bactérienne. Elle se produit grâce à une importante et complexe communication intercellulaire entre les cellules résidentes peuplant les tissus parodontaux : les cellules épithéliales ainsi que les cellules du système immunitaire. La réponse de l'hôte est orchestrée par de nombreux médiateurs chimiques qui jouent un rôle clé dans sa régulation.

Le système immunitaire s'organise en deux composantes : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. La réponse innée va constituer le premier rideau de défense qui, s'il s'avère insuffisant, sera suivi de la mise en place de la réponse adaptative.

a. Les acteurs de la réponse innée

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre une agression extérieure. Elle est immédiate et non spécifique.

Dans le système immunitaire inné, on distingue l'immunité innée humorale de l'immunité innée cellulaire.

i. La réponse immunitaire innée humorale

Le système immunitaire inné humoral présente divers mécanismes barrière contre la présence de pathogènes chez l'hôte (figure 4) :

- le système du complément,
- les récepteurs de reconnaissance de pathogènes « PRR » solubles,
- les peptides antimicrobiens : les défensines, les cathélicidines et les histatines.

Ces différentes barrières du système immunitaire inné s'activent par la reconnaissance de motifs antigéniques exprimés par l'agent pathogène : les motifs moléculaires associés aux pathogènes « PAMP ».

Le système du complément

Le système du complément rassemble un groupe de protéines sériques s'activant selon trois voies : deux basées sur la reconnaissance directe (voie des lectines et voie alterne) ou une dernière sur la reconnaissance indirecte des pathogènes (voie classique).

Les récepteurs de reconnaissance de pathogènes solubles

Ils rassemblent plusieurs protéines, notamment la protéine de reconnaissance de LPS (lipopolysaccharide).

Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont représentés par les défensines (alpha et bêta), les histatines et par les cathélicidines.

Les protéines de l'immunité innée humorale agissent en détruisant le pathogène soit directement, par exemple par la formation du complexe d'attaque membranaire, soit indirectement par le processus d'opsonisation. L'opsonisation facilite la phagocytose des pathogènes par les cellules phagocytaires.

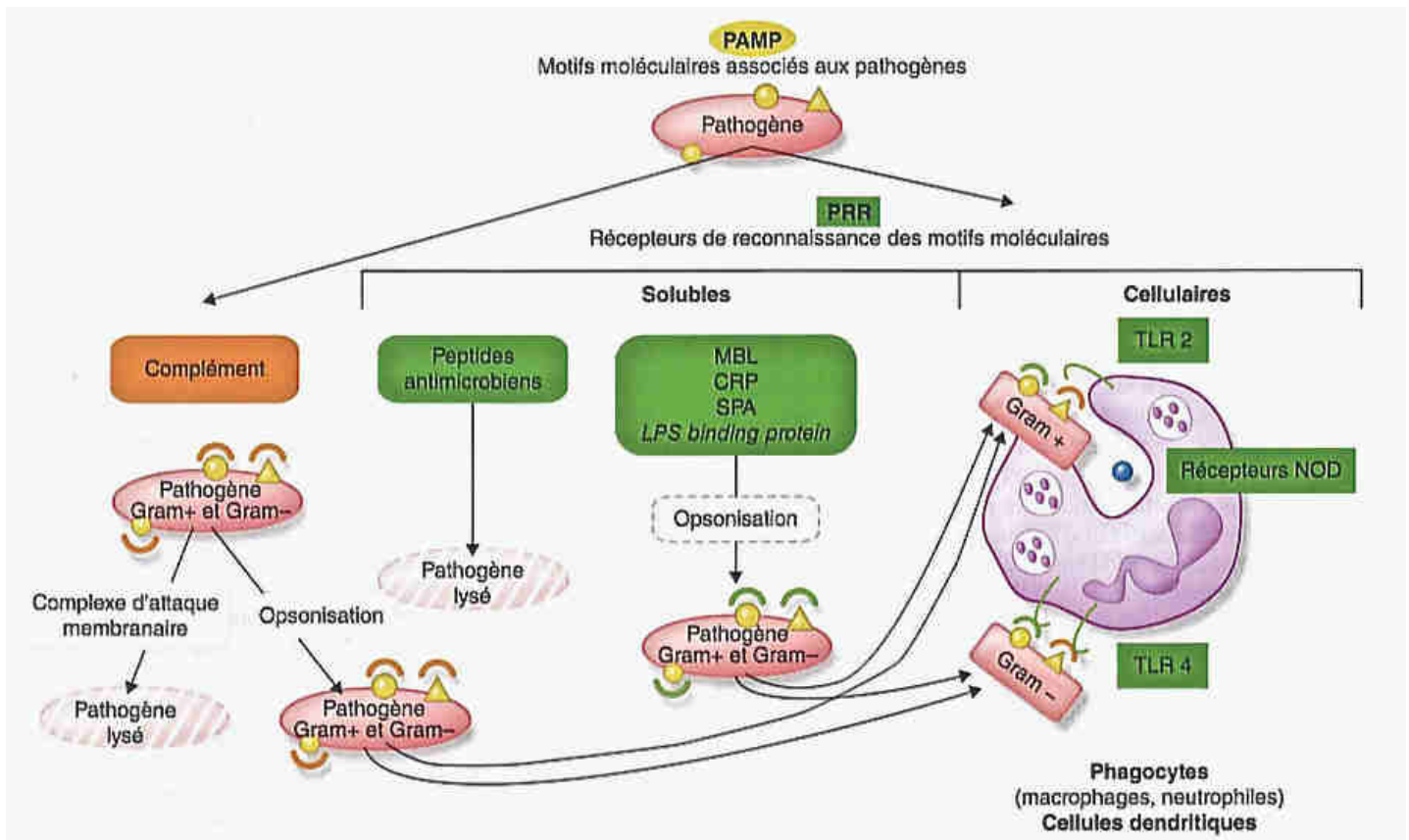


Figure 4 : Les récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) (2)

ii. La réponse immunitaire innée cellulaire

Les cellules de l'immunité innée présentent à leur surface des récepteurs permettant la reconnaissance des PAMP : les récepteurs *toll-like* (TLR) et les récepteurs type NOD (*nucleotid binding oligomerization domain*). La reconnaissance des PAMP par ces récepteurs déclenche une cascade de signalisation intra-cellulaire qui concerne des voies moléculaires impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire, notamment les voies des MAPK et les voies associant NF-κB.

Parmi les cellules de l'immunité innée, on distingue trois types cellulaires doués d'une activité de phagocytose :

- les polymorphonucléaires neutrophiles (PNN),
- les macrophages,
- les cellules dendritiques.

On retrouve également, les cellules *natural killer*, les polynucléaires basophiles et éosinophiles ainsi que les mastocytes.

Les polynucléaires neutrophiles sont les leucocytes majoritaires dans l'organisme. De par leur nombre et leur activité phagocytaire, ils sont la barrière cellulaire la plus importante du premier rideau de défense. Ces cellules interviennent en abondance lors de la réponse à une agression bactérienne contre le parodonte. Elles sont présentes spontanément dans le sulcus et l'épithélium sulculaire et forment ainsi la première ligne de défense face aux pathogènes ; mais ils peuvent également être recrutés plus massivement par chimiotactisme lors d'une agression extérieure. À l'issue de la phagocytose des pathogènes, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et des enzymes telles que les MMP (métalloprotéases matricielles) qui contribuent à optimiser la réponse inflammatoire, ceci occasionnant également une lyse tissulaire chez l'hôte.

Avec les macrophages, les cellules dendritiques jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes permettant la transition de la réponse immunitaire innée vers la réponse immunitaire adaptative.

b. Les acteurs de la réponse adaptative

La réponse immunitaire adaptative (ou acquise) intervient dans un second temps et fait suite à la réponse immunitaire innée, lorsque celle-ci ne parvient pas à enrayer l'agression d'un pathogène. Elle se caractérise par sa spécificité pour un antigène donné. Parmi les cellules de l'immunité adaptative, on distingue les lymphocytes B et les lymphocytes T.

i. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B vont être à l'origine de la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale. Les lymphocytes B expriment à leur surface des immunoglobulines et le CMH II qui permettent la reconnaissance d'un antigène circulant ou d'un antigène présenté par une CPA. La reconnaissance d'un antigène va entraîner la division cellulaire du lymphocyte en deux sous-types de cellules différenciées : les plasmocytes et les lymphocytes B mémoire. Les plasmocytes vont sécréter les anticorps spécifiques de l'antigène rencontré. Les lymphocytes B mémoire sont des cellules à durée de vie longue qui continuent d'exprimer l'anticorps dirigé vers l'antigène rencontré et permettent une réponse immunitaire plus rapide lors de la reconnaissance ultérieure du même antigène.

ii. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T se distinguent en deux sous-types cellulaires : les lymphocytes T portant les molécules membranaires CD4 et ceux portant CD8. Ils portent un récepteur : le TCR (*T cell receptor*).

Les lymphocytes T CD4⁺ sont appelés lymphocytes T auxiliaires ou T *helper* et présentent différentes sous-populations :

- Th1 : impliqués dans l'immunité cellulaire et l'élimination des pathogènes intracellulaires,
- Th2 : impliqués dans l'immunité humorale et l'élimination des pathogènes extracellulaires,
- Th17 : ces lymphocytes ont d'importantes propriétés pro-inflammatoires de par les cytokines qu'ils libèrent, notamment grâce à leur propriété d'activation des polynucléaires neutrophiles,
- Treg : ils modulent la réaction immunitaire en inhibant ou stimulant la différenciation des lymphocytes.

Le récepteur des LT CD4⁺ interagit avec le complexe Ag-CMH II des cellules présentatrices d'antigène.

Les lymphocytes T CD8+ sont appelés lymphocytes T cytotoxiques. Ils ont une activité lytique contre les pathogènes et les cellules infectées. Leur récepteur TCR interagit avec le complexe Ag-CMH I. Leur activité et leur prolifération sont dépendantes des LTh et de la reconnaissance d'un complexe Ag-CMH 1.

c. La régulation de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire est finement régulée par des signalements inter-cellulaires afin de coordonner l'intervention des différents types de cellules. La régulation joue un rôle important dans l'élimination complète du pathogène tout en limitant les dégâts tissulaires provoqués chez l'hôte. Les cytokines sont des médiateurs importants dans cette régulation. Elles sont sécrétées à la fois par des cellules immunitaires mais aussi par des cellules non-immunitaires. Les cytokines rassemblent : les facteurs de stimulation, les interleukines (IL), les chimiokines, le « *Tumor Necrosis Factor* » (TNF) et les interférons (IFN). Elles ont des propriétés soit anti-inflammatoires, soit pro-inflammatoires. Parmi elles, certaines cytokines pro-inflammatoires sont fortement associées aux maladies parodontales par leur concentration augmentée dans les sites atteints : TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17.

Dans les maladies parodontales, plusieurs études démontrent l'augmentation de la concentration de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dans les sites atteints avant traitement et une diminution de leur concentration après traitement.

d. La réaction inflammatoire parodontale

La cavité buccale étant un milieu septique, le parodonte est en permanence exposé aux micro-organismes. Il existe une réponse protectrice de l'hôte par la présence permanente de cellules leucocytaires résidentes dans le parodonte sain. Dans une situation clinique saine, on constate la présence spontanée d'un infiltrat inflammatoire modéré qui reflète l'homéostasie tissulaire.

Les PAMP bactériens sont reconnus par les TLR des cellules résidentes (kératinocytes, fibroblastes, cellules dendritiques, macrophages). Lors de la reconnaissance des motifs bactériens, tels que le LPS, les cellules résidentes libèrent

des médiateurs chimiques pro-inflammatoires (amines vasoactives, $\text{TNF-}\alpha$) qui permettent une vasodilatation et le recrutement plus massif des cellules de l'immunité innée, telles que les PNN, vers les sites infectés.

Les PNN sont les cellules de l'immunité innée présentes dans un contexte physiologique sain au niveau du parodonte. Il existe en effet un flux permanent de ces cellules qui est adapté en fonction de la charge de micro-organismes présente au niveau sulculaire afin de garantir l'homéostasie tissulaire.

Les PNN sont secondés dans leur rôle de cellule phagocytaire par le recrutement de macrophages. Ces cellules phagocytaires sont fortement recrutées lors de la première réaction du système immunitaire à la présence de bactéries.

En présence d'un milieu riche en molécules pro-inflammatoires, on note une forte activité lytique des enzymes libérées par les cellules résidentes. Lorsque l'infection persiste et que la réponse immunitaire innée ne parvient pas à enrayer l'agression bactérienne, les cellules de l'immunité innée assurent la transition de la réponse immunitaire vers une réponse immunitaire adaptative en libérant des médiateurs chimiques permettant le recrutement des cellules lymphocytaires et en assurant leur fonction de présentation d'antigène aux lymphocytes afin d'induire une réponse spécifique contre les agents agresseurs.

4. Atteintes tissulaires

a. Aspects histopathologiques et anatomopathologiques (14) (24)

La rupture de l'homéostasie parodontale se traduit par quatre étapes histopathologiques de sévérité graduelle : la lésion initiale, la lésion précoce, la lésion établie et la lésion avancée. Chacune caractérise un aspect histologique et un aspect clinique.

i. Lésion initiale (figure 5)

La lésion initiale survient en moyenne deux à quatre jours après le dépôt du biofilm oral. On note :

- une dilatation vasculaire,
- une augmentation du fluide gingival,
- une arrivée plus importante des PNN dans le sulcus,
- une altération de la partie coronaire de l'épithélium de jonction.

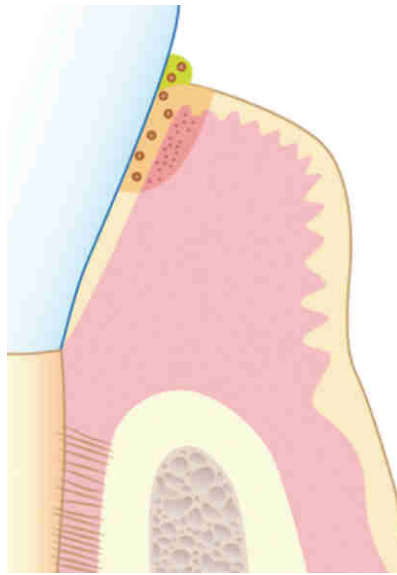


Figure 5 : la lésion initiale (24)

ii. Lésion précoce (gingivite débutante ; figure 6)

La lésion précoce survient après une semaine de présence de biofilm oral.

On note :

- une augmentation des phénomènes de la lésion initiale,
- une gencive marginale érythémateuse,
- une prolifération des cellules de l'épithélium de jonction et de l'épithélium sulculaire,
- une altération des fibroblastes et l'initiation de l'altération du réseau collagénique,
- une arrivée massive de lymphocytes.

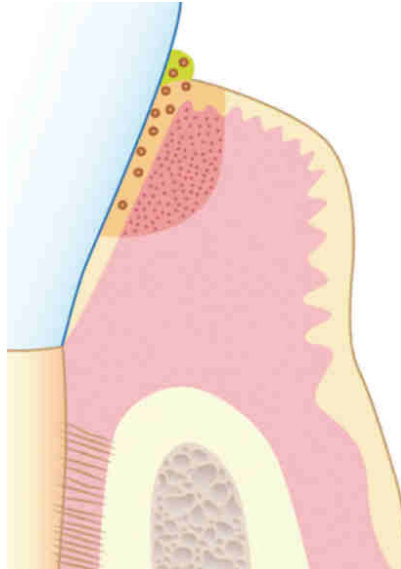


Figure 6 : La lésion précoce (24)

iii. Lésion établie (gingivite ; figure 7)

Le temps écoulé pour le passage de la lésion précoce à la lésion établie dépend de la susceptibilité de l'hôte.

On observe :

- une diminution des populations de lymphocytes T et augmentation des populations de lymphocytes B et de plasmocytes,
- une altération importante du réseau collagénique,
- une progression apicale et latérale de l'épithélium de jonction pouvant résulter en la formation d'un épithélium de poche,
- une atteinte uniquement conjonctive sans atteinte osseuse.

Cet état clinique peut perdurer pendant de nombreuses années mais est susceptible de basculer en quelques mois vers une progression plus avancée de la pathologie (parodontite), en fonction de la présence de divers facteurs de risques et de la susceptibilité de l'hôte.

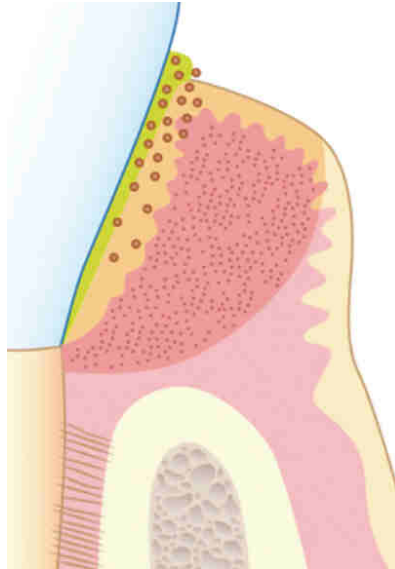


Figure 7 : La lésion établie (24)

iv. Lésion avancée (parodontite ; figure 8)

Dans cet état, on observe :

- une progression apicale importante,
- une atteinte du desmodonte et de l'os alvéolaire,
- une migration de plus en plus apicale des structures épithéliales,
- la formation de poches parodontales.

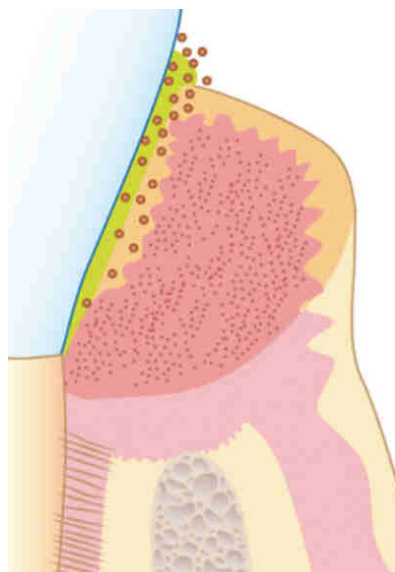


Figure 8 : La lésion avancée (24)

b. La destruction tissulaire

Les bactéries jouent un rôle direct et indirect dans la destruction tissulaire. Les bactéries sécrètent des enzymes directement responsables de la dégradation tissulaire dans un but nutritif mais aussi dans le but de créer un environnement spatial favorable au développement des populations bactériennes. D'autre part, les motifs moléculaires bactériens (tels que LPS) déclenchent, chez l'hôte, la sécrétion d'enzymes impliquées dans la dégradation tissulaire, et déclenchent aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui aboutissent à la mise en place d'une réaction inflammatoire importante.

i. La destruction du tissu conjonctif (25) (26)

Les métalloprotéases matricielles (MMP) sont les principales enzymes impliquées dans la dégradation du tissu conjonctif en dégradant le collagène de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. Elles ont par ailleurs un rôle sur l'activité des cytokines. Les MMP sont inhibées par les TIMP. Ces deux molécules sont impliquées dans l'homéostasie du tissu conjonctif.

Lors de la réaction inflammatoire parodontale, les PNN, les ostéoblastes, les fibroblastes et les cellules épithéliales sécrètent abondamment ces MMP du fait de la stimulation par les cytokines telles que le $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 et IL-6. On observe en parallèle une diminution de la concentration des TIMP. Les principales MMP impliquées dans la maladie parodontale sont les MMP-8, -9 et -2.

Les bactéries sécrètent aussi des enzymes impliquées dans la destruction du tissu conjonctif mais essentiellement dans le but de favoriser la colonisation bactérienne ; leur rôle dans la destruction directe du tissu conjonctif est relativement mineur.

L'activité enzymatique par les cellules de l'hôte dans le tissu conjonctif permet d'aménager un environnement propice à l'arrivée des cellules lymphocytaires. Sa dérégulation a cependant pour corolaire de détruire irréversiblement les tissus et de permettre la propagation bactérienne. Au fur et à mesure de la progression apicale de l'atteinte conjonctive, celle-ci se rapproche du tissu osseux.

ii. La destruction du tissu osseux (27)

La stabilité du tissu osseux dépend d'un équilibre entre cycles d'apposition et cycles de lyse osseuse. Les cellules impliquées dans la lyse osseuse sont les ostéoclastes, celles impliquées dans l'apposition osseuse sont les ostéoblastes. Sous l'influence des médiateurs présents dans le tissu osseux alvéolaire, il y aura une prédominance dans la différenciation des cellules précurseurs en ostéoclastes ou en ostéoblastes.

L'activité de remodelage osseux est dépendante de la balance RANK-L/OPG. Le récepteur RANK est exprimé par les précurseurs ostéoclastiques. RANK-L est, entre autres, exprimé par les cellules conjonctives et les cellules lymphocytaires. Il permet la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes. L'OPG est sécrétée par les cellules conjonctives gingivales et desmodontales. Elle présente une forte affinité pour RANK-L et empêche l'interaction entre RANK et RANK-L, limitant la différenciation ostéoclastique et inhibant donc l'activité ostéoclastique.

Au cours de la parodontite, plusieurs médiateurs sécrétés sont identifiés comme étant à l'origine de l'activité ostéoclastique : $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-17, PGE2. Par ailleurs, les ostéoclastes expriment également des TLR qui, en reconnaissant des motifs bactériens, vont stimuler l'activité des ostéoclastes.

L'alvéolyse au cours de la parodontite résulte du déséquilibre du remodelage osseux où on observe un ratio RANK-L/OPG élevé en raison de la production importante de cytokines pro-inflammatoires qui vont stimuler la différenciation ostéoclastique (figure 9).

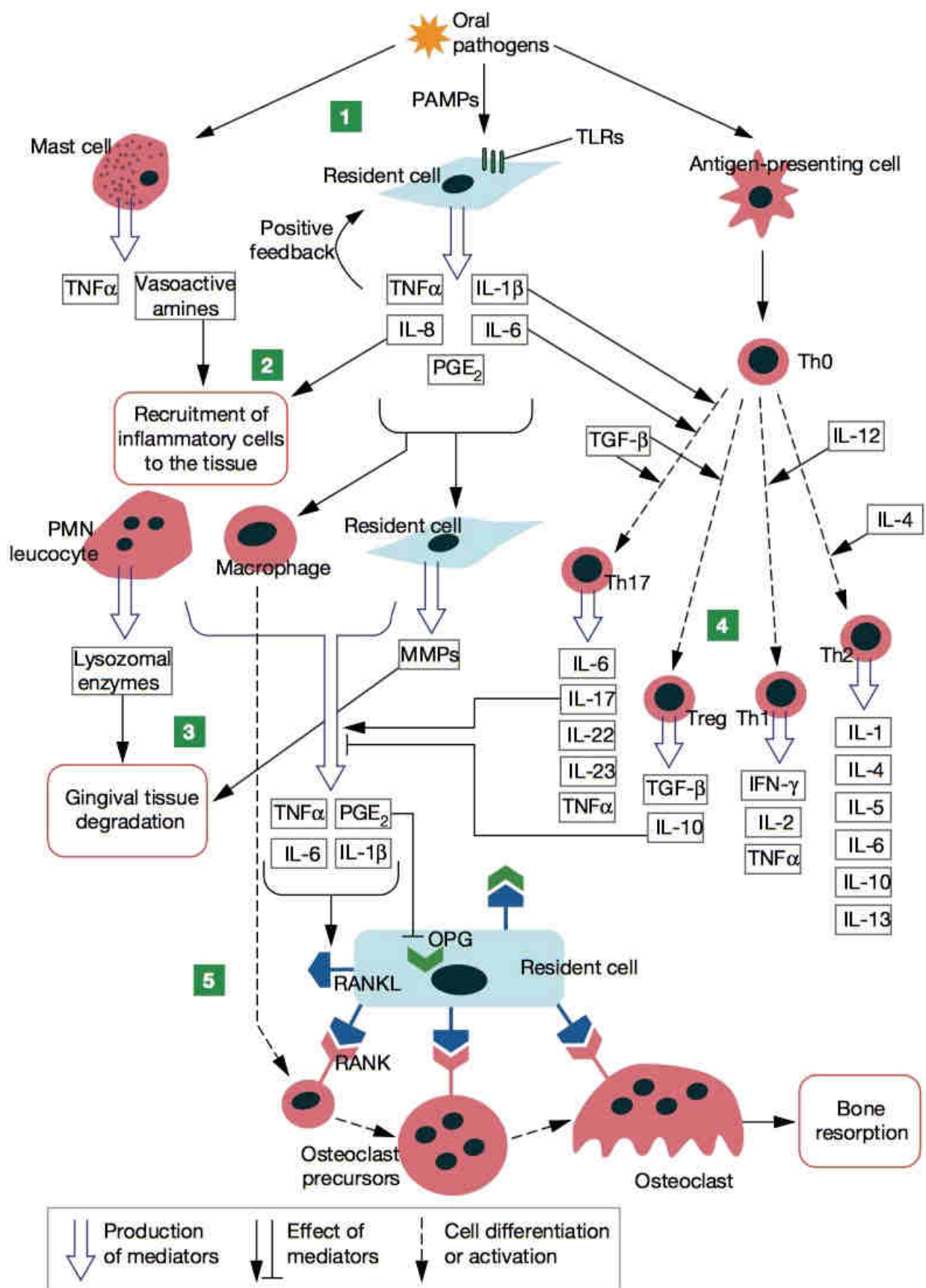


Figure 9 : les médiateurs inflammatoires impliqués dans la résorption tissulaire des tissus parodontaux (27)

La maladie parodontale est liée à la présence des bactéries parodontopathogènes qui vont induire une réponse du système immunitaire ainsi qu'une réaction inflammatoire plus ou moins importante. Néanmoins, l'unique présence d'un microbiote parodontopathogène n'est pas suffisante pour induire les signes cliniques de la maladie. C'est l'effet cumulatif de la dysbiose du microbiote ainsi que de la dérégulation de la réaction immuno-inflammatoire qui illustre la susceptibilité de l'hôte à la maladie parodontale. Cette dérégulation de la réaction de l'hôte se traduit par un environnement moléculaire riche en molécules pro-inflammatoires et en cellules clastiques à l'origine d'un métabolisme tissulaire destructeur. L'homéostasie tissulaire du parodonte est sous la dépendance de mécanismes de régulation complexes qui impliquent de nombreux médiateurs cellulaires et de nombreuses voies de signalisation cellulaires. Dans quelle mesure les micro-ARN peuvent-ils jouer un rôle dans la modulation de ces mécanismes ?

Partie II : Généralités sur les micro-ARN

1. Rappels et définitions sur l'expression génique : transcription, traduction et régulation post-transcriptionnelle

Ayant lieu dans le noyau, la transcription est le processus par lequel la séquence ADN d'un gène est transcrite en une séquence composée d'acides ribonucléiques (ARN) qui sera par la suite traduite en protéines. La transcription est réalisée par des enzymes particulières : les ARN polymérases (I, II et III) qui permettent la synthèse des pré-ARN messagers (pré-ARNm), des ARN ribosomiques (ARNr), des ARN de transfert (ARNt), des ARN guides et ARN régulateurs. Dans le noyau, les pré-ARNm subissent des modifications et une maturation les transformant en ARNm. Les ARNm constituent le support de lecture de la machinerie de synthèse des protéines. L'ARNm est la molécule finale qui pourra être lue par la machinerie traductionnelle de la cellule pour la synthèse des protéines : c'est la traduction. La régulation post-transcriptionnelle se définit comme un procédé de régulation de l'expression génique ayant lieu entre la transcription et la traduction (28).

2. Définition des micro-ARN

Les micro-ARN sont des molécules d'ARN simple brin, d'une vingtaine de nucléotides, non codantes, endogènes et issues de la transcription de l'ADN nucléaire. Ils participent à la régulation de l'expression génique post-transcriptionnelle en interagissant avec les ARN codants. Par leurs interactions avec les ARN codants, ils vont soit déstabiliser leur forme structurelle, soit inhiber leur lecture par les complexes moléculaires impliqués dans la traduction ou encore déclencher leur dégradation (29). 1 à 2 % du génome sert à la transcription des micro-ARN et environ 60% des gènes codant pour des protéines seraient des cibles de micro-ARN (30). Ils ont ainsi un rôle à jouer dans de nombreuses fonctions métaboliques et physiologiques au sein de l'organisme et leur dérégulation pourrait être impliquée dans diverses pathologies (29).

3. Historique sur les micro-ARN

a. L'interférence

L'interférence est un processus moléculaire par lequel un ARN anti-sens non codant va interagir avec un ARNm complémentaire afin d'empêcher sa traduction en protéine. Le phénomène d'interférence a été découvert de manière fortuite, à la fin des années 1990, par une équipe américaine composée des deux biologistes Andrew Fire et Craig C. Melo. Au cours de leurs travaux, ils ont observé que l'injection d'ARN double-brin chez *Caenorhabditis elegans* conduisait à la répression de l'expression du gène dont l'ARNm était complémentaire de l'ARN double-brin introduit expérimentalement (31). Ils reçurent le prix Nobel de physiologie et de médecine, en 2006, pour cette découverte majeure.

b. Découverte des micro-ARN

Le premier micro-ARN fut découvert en 1993, lors des travaux de Victor Ambros et son équipe, chez *Caenorhabditis elegans* (32). Chez *C. elegans*, Ambros observa en 1984 le rôle prépondérant des gènes *lin-4* et *lin-14* dans le développement des larves de ce ver. Chez ce dernier, 4 stades larvaires étaient identifiés : chronologiquement L1 à L4. *lin-14* était décrit comme étant impliqué dans l'acquisition de caractéristiques cellulaires précoces du stade larvaire alors que *lin-4* était décrit comme étant impliqué dans l'acquisition de caractéristiques tardives (33). Dans une étude de 1989 menée par Ambros, des mutants *lin-4* et *lin-14* confirmèrent ces informations et l'hypothèse formulée par le biologiste était que *lin-4* était à l'origine de l'inhibition de l'expression de *lin-14* (34). En 1993, son équipe démontre que *lin-4* ne code en réalité pas pour une protéine mais pour deux ARN de petite taille dont les séquences sont partiellement complémentaires de l'ARNm de *lin-14* : ce fut là la découverte des premiers micro-ARN (32). La même année, l'équipe de Wightman et al. démontre que cette complémentarité partielle empêche la traduction de l'ARNm de *lin-14* (35).

Dans le génome humain, plus de 2000 micro-ARN ont aujourd'hui été identifiés. Ils sont répertoriés dans la banque de données en ligne « miRBase » (<http://www.mirbase.org>).

4. Biogenèse (voie canonique) (36)

Il existe plusieurs voies de synthèse des micro-ARN. La voie canonique est l'une d'entre elles et est, chez les espèces animales, la voie de synthèse majoritaire (37) (figure 10).

Les micro-ARN sont codés par l'ADN nucléaire à partir duquel ils sont transcrits sous leur forme précoce de micro-ARN primaire appelée « pri-miARN ». Les séquences codant pour les micro-ARN peuvent se retrouver dans des séquences introniques ou exoniques de gènes codant pour des protéines, dépendant alors de son unité de transcription, et peuvent aussi posséder leur propre séquence ADN avec sa propre unité de transcription (38) (39). La biogenèse des micro-ARN débute par la synthèse du pri-miARN par l'ARN polymérase II majoritairement(40) et par l'ARN polymérase III plus rarement (40) (41). Le pri-miARN présente une structure double-brin en épingle à cheveux avec un appariement imparfait (constituant des boucles structurales) et est composé de plusieurs centaines à plusieurs milliers de nucléotides protégés par une coiffe 7-méthylguanosine à l'extrémité 5' et une queue poly(A) à son extrémité 3' (polyadénylation). Ce pri-miARN est ensuite épissé par un complexe appelé « microprocesseur », regroupant l'enzyme Drosha (ribonucléase III) et la protéine DGCR8 (sous forme homo-dimérique), pour donner un pré-miARN conservant une structure double-brin en épingle à cheveux et pouvant compter jusqu'à 100 nucléotides. Le pré-miARN contient une extrémité 3' libre. Grâce à son extrémité 3', le micro-ARN se lie à une karyophérine : l'exportine 5. S'ensuit alors l'exportation du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme au travers de l'exportine 5 pour la suite de sa maturation. Dans le cytoplasme, la ribonucléase III Dicer poursuit son clivage en supprimant sa structure en épingle à cheveux. L'activité de Dicer, chez l'Homme, fait intervenir des cofacteurs : TBRP et PACT (42). À ce stade, sa structure est en double-brin simple (mi-ARNdb) asymétrique comprenant le brin de micro-ARN mature dit « brin guide » et un brin anti-sens dit « brin passager ».

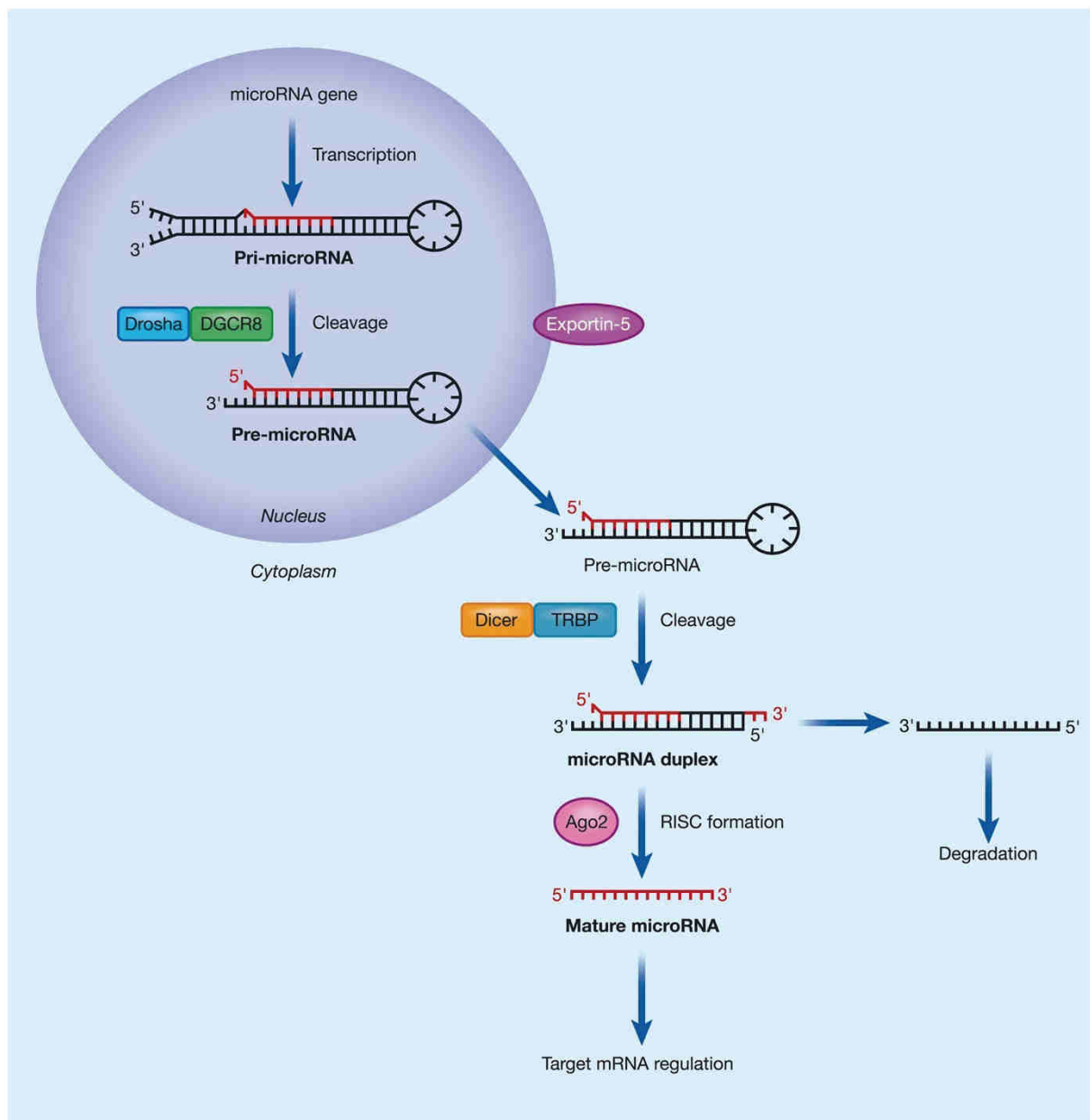


Figure 10 : Biogenèse des micro-ARN (43)

5. Nomenclature (44)

Le nom des premiers micro-ARN découverts était établi selon leur fonction ou leur locus. Par exemple, le nom du micro-ARN lin-4 renvoie en fait au locus lin-4 qui contient sa séquence génomique. Au fur et à mesure du développement des travaux de recherche autour de ces molécules et de la découverte de nombreux nouveaux micro-ARN, apparut la nécessité d'établir une nomenclature précise et universelle.

Depuis une quinzaine d'années, les micro-ARN nouvellement découverts sont nommés selon le format standard suivant : miR(r)-x. « mir » définit un pri-miARN alors que « miR » (« R » majuscule) définit un micro-ARN mature. « x » correspond à un numéro attribué dans un ordre croissant selon la chronologie de découverte.

Au format standard peut s'adjoindre un préfixe qui désigne l'espèce à laquelle se rattache le micro-ARN. Par exemple, miR-155 fut initialement découvert chez la souris et fut retrouvé également chez l'homme dans une étude de 2004. (45) Pour désigner miR-155 chez l'Homme, le préfixe « hsa » (pour *Homo sapiens*) s'y ajoute : hsa-miR-155.

Au format standard viennent également s'adjoindre des suffixes qui viennent préciser la nature du micro-ARN :

- un chiffre peut y être ajouté pour désigner les micro-ARN qui peuvent être synthétisés depuis plusieurs localisations génomiques. Par exemple, pour le micro-ARN hsa-miR-199, on retrouve deux types de pré-miARN selon la localisation génomique : hsa-mir-199-1 et hsa-mir-199-2 qui sont respectivement localisés sur le chromosome 19 et sur le chromosome 1 ;
- les suffixes « 3p » et « 5p » désignent les deux micro-ARN qui sont issus du pré-miARN selon qu'ils proviennent de l'extrémité 3' du pri-miARN ou de l'extrémité 5' du pré-miARN ;
- une lettre peut également s'ajouter pour désigner des micro-ARN dont les séquences nucléotidiques sont très proches et qui ne diffèrent que par un ou deux nucléotides. Par exemple, hsa-miR-199a-5p et hsa-miR-199b-5p sont deux micro-ARN très proches qui diffèrent uniquement de deux nucléotides.

6. Mécanismes d'action

a. Principes de l'interaction entre micro-ARN et ARNm

Le mi-ARNdb est ensuite pris en charge par un regroupement trimérique composé des protéines Argonaute (Ago), TBRP et Dicer ; l'ensemble formant le complexe RISC. Dans le complexe RISC, la protéine Argonaute sélectionne le brin complémentaire de l'ARNm cible. Le brin passager est éliminé mais des études tendent à montrer leur rôle alternatif dans la régulation post-transcriptionnelle (46) (47).

Le complexe RISC, grâce au brin guide, va reconnaître l'ARNm cible par complémentarité au niveau de la région 3'UTR (48). Des appariements dans la région 5'UTR ou dans la région codante ont également été décrits (49). Il est à noter que l'appariement entre le micro-ARN et l'ARNm est le plus souvent imparfait chez les espèces animales (50).

b. Mécanismes de régulation post-transcriptionnelle par les micro-ARN

Une fois le brin guide pris en charge par le complexe RISC et apparié à son ARNm cible, plusieurs mécanismes de régulation peuvent se produire. La dégradation, la déstabilisation ou l'inhibition de la traduction.

La dégradation de l'ARNm est un événement qui survient uniquement en cas d'appariement parfait entre le brin guide et l'ARNm cible : la protéine Ago2 s'active et exerce sa fonction endonucléasique (51). L'appariement parfait étant un phénomène rare chez les espèces animales, ce processus de régulation est minoritaire (50). Les autres mécanismes de régulation ont lieu en cas d'appariement incomplet et sont énoncés ci-dessous (figure 11).

La déstabilisation de l'ARNm se fait par un processus de déadénylation à l'extrémité 3' de l'ARNm. Le complexe miRISC recrute la protéine GW182 qui recrute un complexe enzymatique à activité poly(A)-déadénylase (52). Le micro-ARN, se retrouvant sans coiffe à son extrémité 3', est dégradé par une exoribonucléase : XRN1 (53).

L'inhibition de la traduction est un autre mécanisme de régulation. Deux modes d'inhibition de la traduction ont été décrits : un premier mode se produisant après le début de la traduction (élongation) (54) et un deuxième empêchant l'initiation de la traduction. (55)

En sus de ces mécanismes largement étudiés, la littérature décrit également un autre mécanisme : la séquestration des ARNm dans des granules cytoplasmiques appelés « *p-bodies* » (*processing bodies*). (56) (57)

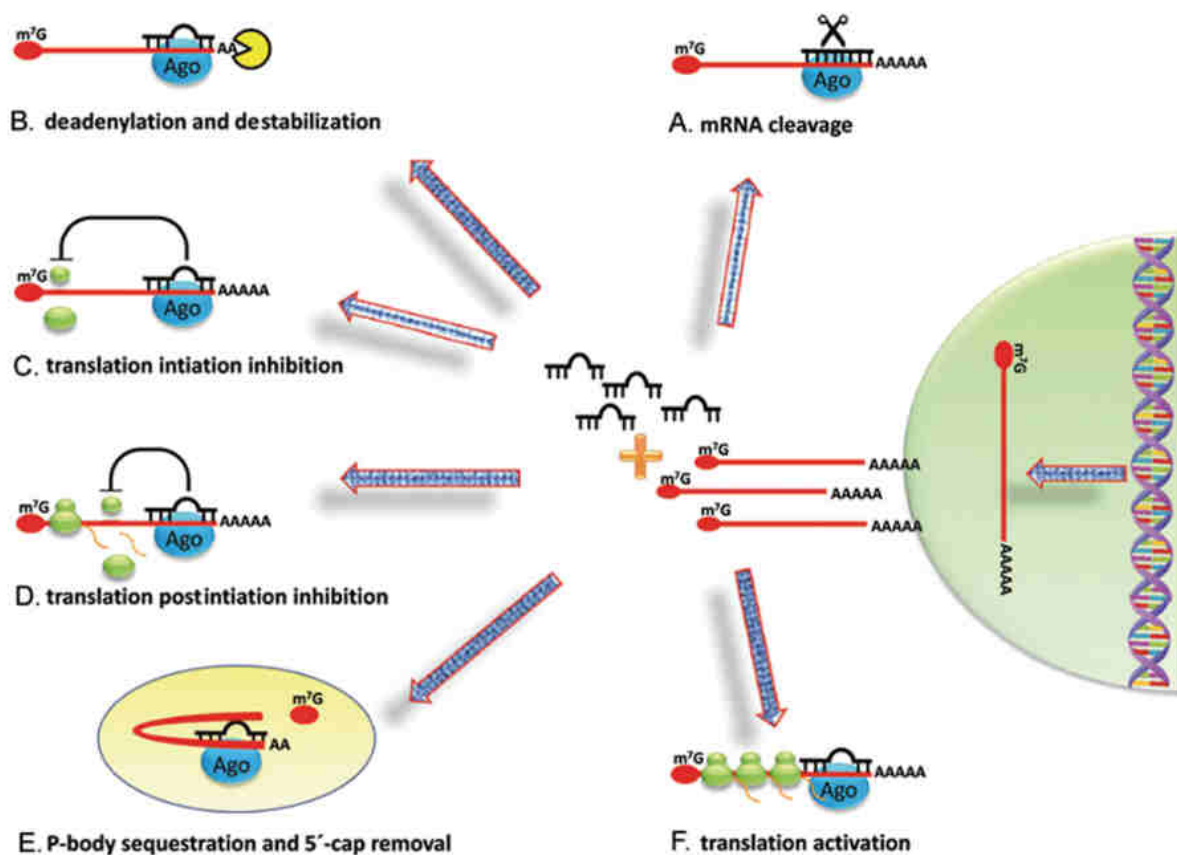


Figure 11 : Mécanismes d'action des micro-ARN. A) Clivage. B) Déstabilisation par déadénylation. C) Inhibition de l'initiation de la traduction. D) Inhibition de l'élongation. E) Séquestration dans les *p-bodies*. F) Activation de la traduction (58)

c. Complexité de la régulation des micro-ARN

La complexité du mécanisme de régulation post-transcriptionnelle des micro-ARN réside en plusieurs points :

- un même micro-ARN peut être exprimé différemment d'un tissu à l'autre, et d'un type cellulaire à l'autre (59),
- un même micro-ARN peut réguler plusieurs centaines de gènes (30),
- un même gène peut être régulé par différents micro-ARN (60),
- les cibles d'action peuvent être intracellulaire ou extracellulaire (61) (62),
- des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle positive sont décrits dans la littérature (63) (figure 11). Par conséquent, les micro-ARN pourraient non seulement réprimer l'activité d'un gène mais également la potentialiser.

7. Fonctions biologiques et physiologiques

Des études récentes ont mis en évidence le rôle des micro-ARN dans divers processus cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, le métabolisme cellulaire ou encore la signalisation intracellulaire (64).

a. Principes de mise en évidence de l'importance des micro-ARN dans les organismes

Pour étudier les rôles biologiques et physiologiques des micro-ARN, des modèles animaux déficients en enzymes Dicer sont utilisés. Le ou les rôles d'un micro-ARN spécifique peuvent également être étudiés via des modèles animaux où la transcription dudit micro-ARN est supprimée.

b. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se compose de différentes phases : G1, S, G2 et M. Des points de contrôle existent entre chacune de ces phases et permettent de vérifier et valider le

bon déroulement de la phase cellulaire achevée afin de passer à la phase cellulaire suivante. La régulation du cycle cellulaire est sous la dépendance de plusieurs protéines et notamment des protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK). Plusieurs micro-ARN ont été identifiés dans la régulation de la stabilité de diverses CDK (65).

Par ailleurs, E2F, facteur de transcription oncogène largement étudié permettant l'entrée de la cellule à la phase S, est à l'origine de la transcription de plusieurs micro-ARN (notamment miR-449a et miR-449b) qui sont impliqués dans une boucle autorégulatrice de la stabilité de E2F (66) (67) (68).

c. Signalisation cellulaire

La prolifération et la différenciation cellulaires sont des événements cellulaires contrôlés par des voies de signalisation moléculaire parmi lesquelles on retrouve par exemple la voie MAPK, PI3K, NF- κ B, TGF- β qui sont des voies moléculaires impliquées de façon importante dans les cancers, les maladies inflammatoires et les maladies auto-immunes et sont largement étudiées. Les micro-ARN semblent moduler ces différentes voies de signalisation en ciblant les ARNm des protéines impliquées dans ces voies (69) (70).

d. Le système immunitaire

Au niveau du système immunitaire, les micro-ARN jouent un rôle dans la différenciation des lignées cellulaires de la réponse immunitaire innée et adaptative. Dans leur article de 2017, Manoj Kumar Kingsley & Vishnu Bhat proposent un schéma récapitulant (figure 12) les micro-ARN impliqués dans la différenciation et le développement des cellules immunitaires (71).

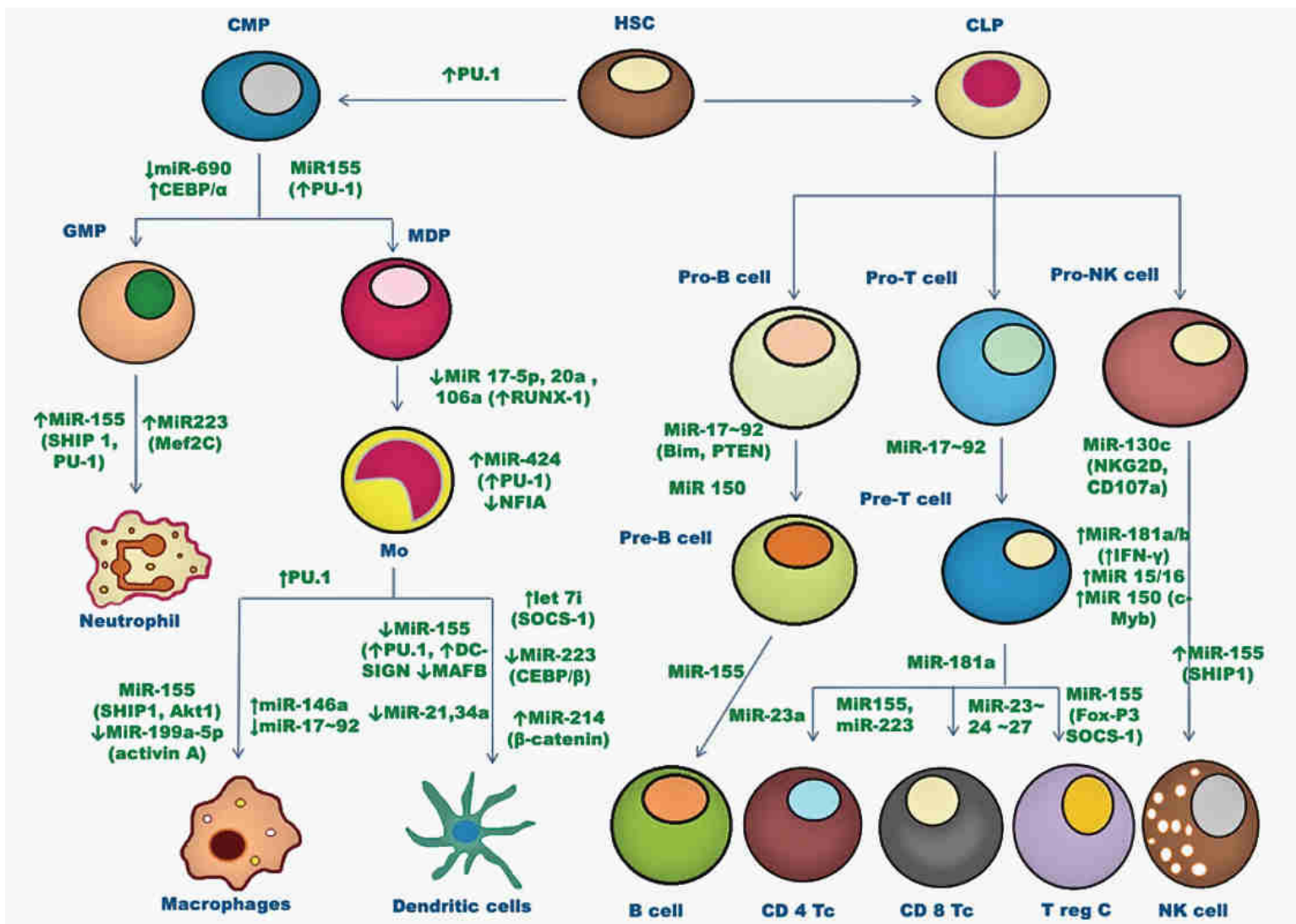


Figure 12 : Les micro-ARN impliqués dans le développement et la différenciation des cellules immunitaires (71)

La réponse immunitaire innée aux agressions bactériennes est déclenchée par l'action des récepteurs *toll-like* (TLR). Les études récentes suggèrent un rôle important des micro-ARN miR-9, miR-125b, miR-146a, miR-155 dans les voies de signalisation des TLR. Le rôle des micro-ARN miR-146 et miR-155 a été mis en évidence dans la régulation des cascades intra-cellulaires déclenchées par l'activation des TLR (72) (73). Par ailleurs, la reconnaissance des LPS dans les macrophages provoque une augmentation de l'expression de miR-155 et miR-125, ce qui supposerait leur rôle dans la réponse aux agressions bactériennes (74).

Dans la réponse immunitaire adaptative, on retrouve à nouveau le rôle prépondérant des micro-ARN miR-146a et miR-155 ainsi que d'autres micro-ARN ayant un rôle important dans la réponse immunitaire adaptative :

- miR-17 et miR-92 : impliqués dans la survie des lymphocytes T (75),
- miR-155 et miR-146a : impliqués dans la polarisation des lymphocytes T (76),
- dans les lymphocytes B : le rôle de miR-155 a été démontré dans la sécrétion des anticorps (76).

8. Implications physiopathologiques

Une des méthodologies des études cherchant à déterminer le rôle des micro-ARN dans les mécanismes physiopathologiques de certaines maladies systémiques consiste en la comparaison des taux de micro-ARN entre des sujets sains et des sujets malades. Plusieurs études ont justement mis en évidence des différences significatives dans les taux de certains micro-ARN entre les sujets sains et les sujets atteints.

a. Rôle potentiel des micro-ARN dans les maladies systémiques

Le rôle des micro-ARN dans différents processus biologiques et physiologiques a largement été démontré. La recherche se penche désormais sur leur implication dans les mécanismes physiopathologiques des maladies systémiques. Le rôle des micro-ARN a ainsi été étudié et des liens ont été établis avec diverses maladies systémiques telles que :

- le cancer (77),
- les maladies cardiovasculaires (78),
- les maladies inflammatoires (79),
- les maladies auto-immunes (80),
- les maladies infectieuses, bactériennes, virales ou fongiques (81),
- les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer (82).

b. Réponse aux agressions bactériennes (83) (84)

La réponse face aux agressions bactériennes est déclenchée par la reconnaissance par les cellules de l'immunité innée de motifs bactériens grâce aux récepteurs *NOD-like* et aux TLR. Cinq micro-ARN sont régulièrement affectés : let-7, miR-21, miR-125, miR-146, miR-155. Ces différents micro-ARN jouent un rôle à différents niveaux des voies de signalisation qui sont activées en aval des TLR et des récepteurs *NOD-like* et qui sont impliquées dans la réponse inflammatoire et immunitaire face aux bactéries. Parmi ces voies, on retrouve notamment la voie NF-κB. De cette façon, ces micro-ARN modulent l'intensité des effets inflammatoires. Par ailleurs, il a également été démontré le rôle d'autres micro-ARN affectés par des organismes bactériens dans la régulation des mécanismes d'autophagie et d'apoptose.

c. Maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes

Les micro-ARN jouent un rôle important dans le développement et la fonction des cellules du système immunitaire et se retrouvent donc impliqués dans la réponse inflammatoire.

La réponse inflammatoire est déclenchée pour faire face à une agression par un pathogène ou à un dommage tissulaire et consiste en un juste équilibre entre des effets anti-inflammatoires et pro-inflammatoires. Ce juste équilibre vise à éliminer l'élément déclencheur et à éliminer ou réparer voire régénérer les tissus et cellules affectés. Lorsque cet équilibre est rompu, l'inflammation est entretenue de façon chronique ; les effets indésirables de l'inflammation persistent et l'état pathologique se maintient ou progresse (85).

Étant donné le rôle des micro-ARN dans la régulation du système immunitaire, ils sont largement étudiés dans les pathologies à composantes inflammatoire et auto-immune. Dans les recherches portant sur ce type de pathologies, on retrouve à nouveau la présence récurrente des micro-ARN miR-146 et miR-155 (76). Par ailleurs, les micro-ARN miR-124, miR-223 et miR-451 sont également retrouvés (86) (87). L'ensemble de ces micro-ARN semblent concourir à la régulation de la réponse immunitaire dans

le recrutement, le développement, la différenciation, le chimiotactisme et la polarisation cellulaires.

La maladie parodontale étant une maladie infectieuse à composantes inflammatoire et immunitaire, notre travail cherchera, ci-après, à préciser le rôle que les micro-ARN pourraient présenter dans la physiopathologie et l'homéostasie parodontales.

Partie III : les micro-ARN dans la maladie parodontale

1. Les micro-ARN d'intérêt en parodontologie

Afin de comprendre le rôle des micro-ARN dans l'homéostasie tissulaire et les pathologies parodontales, de nombreuses études ont cherché à comparer le profil d'expression des micro-ARN entre des groupes de patients atteints de maladie parodontale et des groupes de patients sains. De ce point de départ, les diverses études ont cherché à identifier la fonction des différents micro-ARN surexprimés ou sous-exprimés dans les situations pathologiques afin de scruter leurs rôles physiologiques et physiopathologiques. Les premières études de profilage des micro-ARN en parodontologie sont publiées dès le début des années 2010.

Plusieurs revues de la littérature ont été publiées ces dernières années, collectant les informations recueillies par les études de profilage afin d'identifier les micro-ARN qui présenteraient un intérêt en parodontologie que ce soit :

- dans la compréhension de leur rôle dans le maintien et la rupture de l'homéostasie parodontale,
- ou de leur utilité pour les examens de diagnostic et aussi pour les thérapeutiques.

Une première revue de la littérature a été publiée en 2015 par M. Kebschull et N. Papanou (88) se basant sur toutes les études de profilage existant jusqu'alors, c'est-à-dire quatre études. Les auteurs ont validé la pertinence d'une liste de 19 micro-ARN pour lesquels la littérature (sur base de modèle *in vitro* et de modèles animaux) suggère une implication dans la pathogénie parodontale.

Dans une deuxième revue, publiée en 2017 par Luan et al. (89), les auteurs ont cherché à identifier les micro-ARN impliqués dans l'homéostasie du tissu osseux sur la base de modèles animaux dans des situations ostéogéniques, ostéoclastiques mais aussi inflammatoires afin de déterminer les micro-ARN qui sont associés au métabolisme du tissu osseux et qui sont donc susceptibles de présenter un intérêt pour expliquer les mécanismes de perte osseuse dans les maladies parodontales.

Une troisième revue publiée en 2018 également par Luan et al. (90) confronte des résultats obtenus sur modèles animaux avec les résultats obtenus dans les différentes études de profilage menées chez l'Homme, dans le but de mettre en évidence les micro-ARN pertinents impliqués dans la rupture de la réponse immunitaire et inflammatoire.

a. La réponse immunitaire

L'étude menée par Kebschull et Papapanou (88) a validé une dizaine de micro-ARN qui pourraient être impliqués dans la physiopathologie parodontale.

Les micro-ARN miR-30e et miR-200a sont diminués chez les patients atteints. Ils sont impliqués dans la régulation des cellules *natural killer* en inhibant leur activité cytotoxique et la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α et l'IFN- γ . Leurs diminutions suggèrent donc un rôle dans la dégradation tissulaire.

Un groupe de micro-ARN impliqués dans les voies activant NF-kB, qui est un facteur de transcription impliqué dans la transcription de gènes pro-inflammatoires, est retrouvé dérégulé chez les patients atteints : miR-146a, miR-155, let-7i, miR-486 qui sont augmentés et miR-31 qui est diminué :

- let-7i diminue l'expression des TLR-4,
- miR-486 diminue indirectement l'activation de NF-kB en ciblant des protéines de sa voie de signalisation,
- miR-31 inhibe l'activation de NF-kB,
- miR-146a cible des molécules de la voie de signalisation NF-kB dépendante des TLR, permettant l'activation de NF-kB,
- miR-155 est responsable d'une stimulation de l'activité des cellules NK et d'une augmentation de la sensibilité des TLR au leucotriène B4 et des macrophages. Il interviendrait également dans le maintien de l'activité des lymphocytes Th17 caractérisée par leur production de l'IL-17 et de leur activité pro-inflammatoire. Il serait aussi responsable de l'augmentation de la production de NF-kB, TNF- α et IFN- β .

Du fait de leur rôle et de leur profil, les micro-ARN let-7i, miR-486, et miR-146a semblent limiter l'inflammation, au contraire de miR-155 et de miR-31 qui semblent

avoir un effet pro-inflammatoire. Cependant, d'autres études rapportent des effets anti-inflammatoires de miR-155 notamment par son rôle d'inhibition de la différenciation des LT Th2 (91) ou encore par la diminution de l'expression de TNF- α lorsqu'il est inhibé. (92)

miR-451 et miR-141, respectivement augmenté et diminué chez les patients atteints de parodontite, sont deux micro-ARN impliqués dans l'inhibition du chimiotactisme leucocytaire.

Le micro-ARN miR-486 qui est augmenté chez les patients atteints, perturbe les voies de rétrocontrôle négatif des voies NF-kB, ce qui pourrait majorer l'inflammation.

Le micro-ARN miR-148a diminue dans la fonction de la présentation antigénique par les cellules présentatrices d'antigène. Ce micro-ARN est augmenté chez les patients atteints et est donc susceptible de permettre la prolifération bactérienne.

b. Le métabolisme osseux

Dans leur publication de 2017, Luan et al. (89), sur la base de leurs études et des études déjà menées par d'autres équipes, ont étudié le profil et le rôle des micro-ARN :

- dans la différenciation des ostéoblastes et des cellules souches desmodontales dans un environnement ostéogénique ainsi que dans un environnement inflammatoire,
- dans la différenciation des ostéoclastes.

Les auteurs se proposent de résumer les informations recoupées avec les autres études dans des schémas de synthèse récapitulant les micro-ARN intervenant à divers stades de la différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes (figure 13). Dans un contexte inflammatoire, la dérégulation des micro-ARN miR-17, miR-138, miR-150 et miR-155 limitent la différenciation ostéoblastique tandis que miR-146a a un effet opposé.

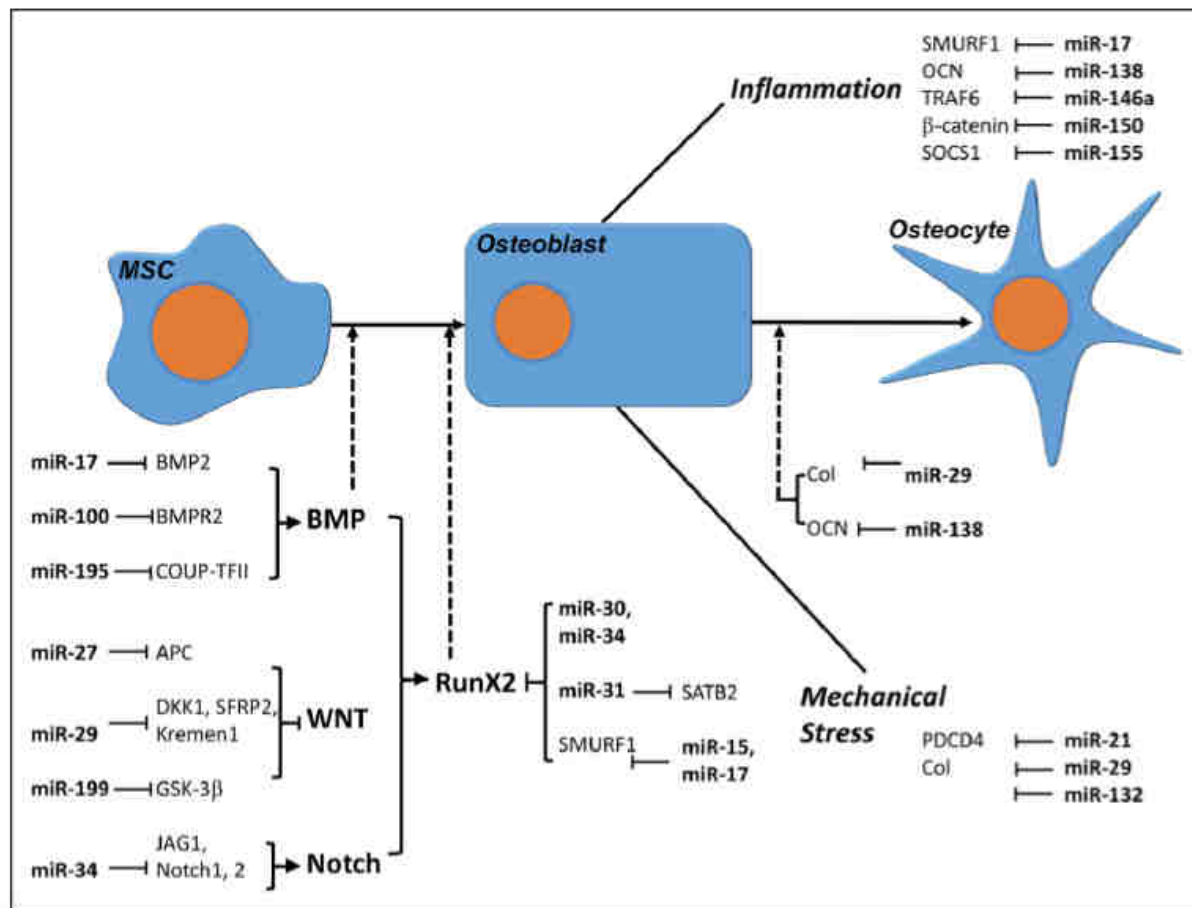


Figure 13 : Le rôle des micro-ARN dans la régulation de l'ostéoblastogenèse (89)

Durant l'ostéoclastogenèse :

- les micro-ARN miR-26a et miR-155 sont augmentés et jouent un rôle de rétrocontrôle négatif dans les voies de différenciation des ostéoclastes,
- les micro-ARN miR-34a, miR-125a, miR-146a, miR-223 et miR-503 sont des inhibiteurs des voies de différenciation des ostéoclastes ; ils sont diminués,
- les micro-ARN miR-21, miR-29 (a,b et c), miR-31 et miR-148 stimulent la différenciation et l'activité des ostéoclastes. Il est intéressant de remarquer que ces micro-ARN sont augmentés dans les études de profilage chez les patients atteints de maladie parodontale, pouvant expliquer l'alvéolyse.

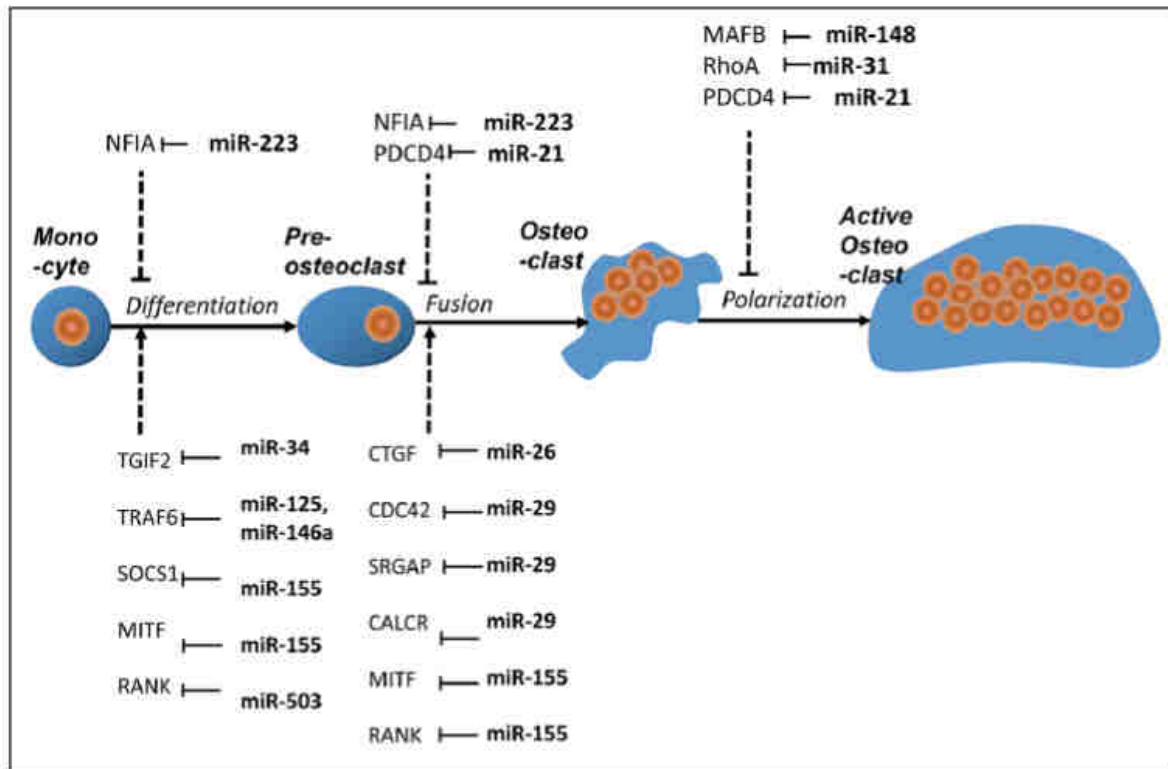


Figure 14 : Le rôle des micro-ARN dans la régulation de l'ostéoclastogénèse (89)

c. La réponse à *Porphyromonas gingivalis*

Les bactéries parodontopathogènes parviennent à altérer et à moduler la réponse de l'hôte afin, d'une part, d'échapper au système immunitaire et d'autre part, d'induire une réaction inflammatoire destructrice permettant le développement d'un environnement propice à la prolifération bactérienne. C'est dans ce contexte que l'expression des micro-ARN suite à l'exposition bactérienne fut étudiée. Plusieurs études *in vitro* révèlent des résultats intéressants sur les micro-ARN exprimés suite à l'exposition au LPS ou de *Porphyromonas gingivalis* dans des cellules de lignée monocyttaire et des macrophages parmi lesquels nous retrouvons notamment des micro-ARN dérégulés régulièrement évoqués dans les études de profilage : let-7i, miR-29b, miR-146a et miR-155 (93). Les bactéries seraient donc susceptibles de modifier le profil d'expression des micro-ARN, afin de détourner la réponse de l'hôte en leur faveur (90) (92).

2. Le micro-ARN : un outil diagnostic ?

a. Détection des micro-ARN

Il existe plusieurs kits d'extraction et de procédures de traitement des micro-ARN. De plus, il existe plusieurs méthodes de détection :

- la RT-PCR,
- le « *microarray* »,
- et le séquençage de nouvelle génération.

Dans les publications en parodontologie, la PCR en temps réel et le « *microarray* » sont celles qui sont majoritairement utilisées.

On distingue deux sources de micro-ARN pour les études cliniques. Il s'agit soit des micro-ARN obtenus directement par des prélèvements tissulaires ou cellulaires, soit par des prélèvements des fluides biologiques.

Les micro-ARN sont effectivement présents dans de nombreux fluides biologiques sous forme circulantes. Une récente étude a pu en identifier dans 12 fluides biologiques dont la salive et le plasma. La salive est un des fluides biologiques où les micro-ARN sont les plus densément présents et où le panel retrouvé est l'un des plus variés. (94)

Les micro-ARN circulants sont retrouvés associés à différentes structures microbiologiques vésiculaires ou extra-vésiculaires (figure 15) :

- les exosomes, qui sont issus de l'invagination de la membrane plasmique des cellules (95) (96),
- des microvésicules de plus grande taille que celles des exosomes (97) (98),
- les corps apoptotiques, auxquels ils s'associent lors la mort cellulaire (99),
- les complexes protéiques formés avec des protéines de la famille Argonaute (Ago2) ou RISC (100),
- Les lipoprotéines, HDL (101) (102).

Les corps apoptotiques sont en réalité un mode d'excrétion passif issu de la dégradation tissulaire et les micro-ARN présents ne semblent pas avoir de rôle biologique.

L'association aux lipoprotéines est minoritaire. Le mode de sécrétion vésiculaire (exosomal et microvésiculaire) représenterait 10% des modes d'excrétion alors que les excréments sous forme de complexes protéiques représenteraient l'autre majorité (101).

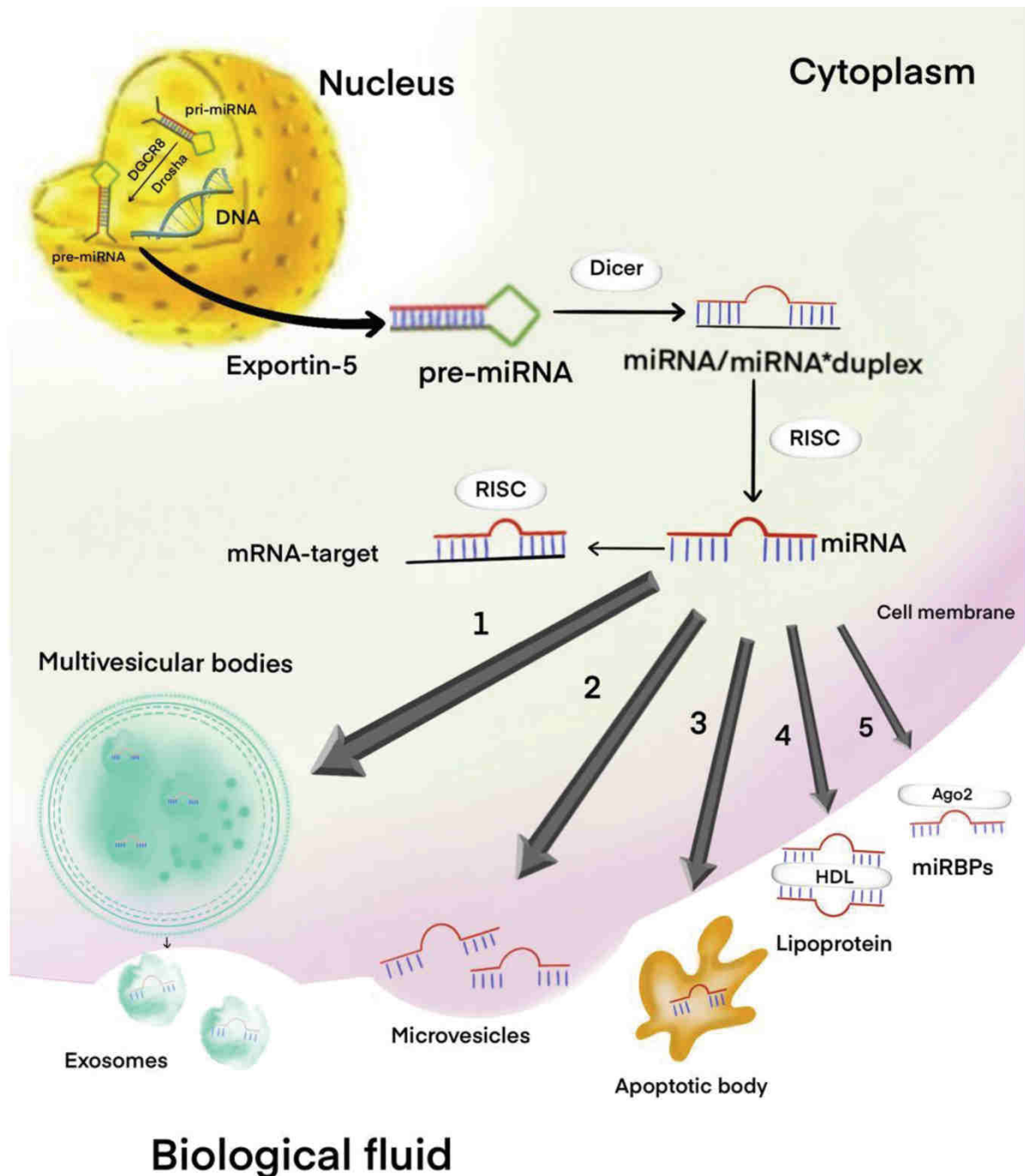


Figure 15 : Modes de sécrétions des micro-ARN circulants. 1) Les exosomes. 2) Les microvésicules. 3) Les corps apoptotiques. 4) Les complexes lipoprotéiques. 5) Les complexes protéiques. (103)

On distingue plusieurs milieux de prélèvement :

- les tissus gingivaux,
- le fluide gingival crévulaire,
- le fluide salivaire,
- le biofilm sous-gingival,
- les cellules souches desmodontales.

Chronologiquement, les premières études sur les micro-ARN en parodontologie utilisent des prélèvements tissulaires, en particulier le tissu gingival et le tissu desmodontal. Ce n'est qu'à partir de 2017 qu'apparaissent les premières études utilisant les fluides biologiques pour analyser le profil des micro-ARN, ces méthodes de prélèvement ayant montré des résultats intéressants pour le diagnostic des cancers de la cavité orale.

b. Les biomarqueurs en parodontologie

i. Définition

Les biomarqueurs sont des molécules quantifiables et caractéristiques d'une condition physiologique ou pathologique.

En parodontologie, on distingue différentes classes de biomarqueurs (104) (tableau 1) :

- les enzymes tissulaires,
- les protéines de l'inflammation,
- les produits métaboliques.

Ces biomarqueurs peuvent être systémiques (sang, sérum) ou locaux (fluide gingival, fluide salivaire).

ii. Biomarqueurs actuels (104)

Les biomarqueurs actuels traduisent la présence de la maladie parodontale et sa sévérité mais n'apportent pas d'information sur l'activité de la maladie, sa progression et son pronostic. Les micro-ARN pourraient constituer une nouvelle classe de

biomarqueurs pouvant pallier ces défauts et leur intérêt pourrait alors permettre d'ajuster les plans de traitement et d'établir des thérapeutiques plus personnalisées. Néanmoins, ce type de test diagnostique doit présenter certaines qualités afin d'assurer leur fiabilité :

- une spécificité, une sensibilité et une prédictibilité satisfaisantes,
- ils doivent être faciles à mettre en place,
- ils doivent être reproductibles.

Tableau 1 : Les biomarqueurs actuels en parodontologie (104)

Biomarqueurs systémiques	Biomarqueurs locaux
SP-D	TNF- α
IgG	ICTP
HDL / LDL	RANK-L/RANK
CRP	MMP / TIMP
IL-6	
ostéocalcine	

Plusieurs problématiques se posent cependant :

- Quels micro-ARN doivent être sélectionnés ?
- Quel(s) milieu(x) de prélèvement privilégier ?

Du fait de l'inhomogénéité méthodologique dans les études de profilage des micro-ARN en parodontologie menées chez l'homme, une multitude de micro-ARN sont trouvés dérégulés d'une publication à l'autre. Il existe cependant un groupe de micro-ARN que l'on retrouve cités avec récurrence parmi toutes ces études et présentés comme étant potentiels biomarqueurs intéressants : miR-21, miR-146a, miR-155, miR-203, miR-205, miR-210 et miR-223.

Les micro-ARN miR-142-3p, miR-146a, miR-155, miR-203 et miR-223 ont notamment été proposés comme biomarqueurs. (105)

Une récente publication de juin 2020 se propose d'effectuer une méta-analyse de 16 micro-ARN issus de 29 études, menées chez l'homme et sur des modèles animaux, afin d'identifier les micro-ARN les plus pertinents en tant que potentiels biomarqueurs. (106)

iii. Méta-analyse des micro-ARN dérégulés

Présentation de l'étude

- Les auteurs ont collecté 1242 articles suite à leurs recherches ;
- 138 articles se sont révélés pertinents après analyse des résumés ;
- 43 articles retenus selon des critères méthodologiques : présence d'un groupe contrôle, renseignement des données de résultat, modèle approprié.

Trois critères d'inclusion des micro-ARN sont établis :

- le micro-ARN doit être dérégulé dans une étude chez l'homme et une étude animale,
- ou il doit être dérégulé dans au moins 2 études animales,
- ou il doit être dérégulé dans au moins 4 études menées chez l'Homme.

Seuls les modèles animaux sont retenus pour le profilage dans les péri-implantites.

11 micro-ARN sont retenus chez l'homme et ne concernent que les parodontites, parmi lesquels 8 d'entre eux sont retrouvés dérégulés de façon significative chez l'homme : miR-24-3p, miR-30e, miR-130a, miR-142-3p, miR-144, miR-146a, miR-210 et miR-223 (valeur- $p < 0,05$). Cependant les auteurs définissent un critère supplémentaire afin de valider définitivement les micro-ARN dérégulés : ceux-ci doivent montrer une dérégulation significative par *microarray* et par RT-PCR. Ainsi ce sont les micro-ARN miR-146a et miR-142-3p qui sont retenus car ils ont été évalués par RT-PCR et par *microarray* et ont montré des variations significatives dans leur profil d'expression pour ces deux méthodes de détection. Ces deux micro-ARN sont en effet surexprimés chez les patients atteints de maladie parodontale. Les auteurs concluent par ailleurs, sur la base de leur analyse statistique, que le *microarray* est plus sensible que la RT-PCR pour la détection des micro-ARN.

<i>Periodontal Health vs. Periodontitis (Humans)</i>						
miRNA	Lab Test	Fold.Dif	SE	CI 95%	p-Value	I ²
miR 24-3p	Microarray	0.58	0.29	0.00 1.16	0.049*	62.0%
	RT-PCR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
miR 27b-3p	Microarray	0.05	0.22	-0.37 0.48	0.803	93.1%
	RT-PCR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
miR 30e	Microarray	2.34	1	0.37 4.31	0.020*	60.5%
	RT-PCR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
miR 130a	Microarray	2.84	0.82	1.23 4.44	<0.001***	0.0%
	RT-PCR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
miR 132	Microarray	0.75	1.22	-1.65 3.15	0.538	85.1%
	RT-PCR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
miR 142-3p	Microarray	2.71	0.39	1.94 3.47	<0.001***	0.0%
	RT-PCR	2.54	0.93	0.72 4.53	0.006**	54.8%
miR 144	Microarray	1.97	0.37	1.24 2.71	<0.001***	0.0%
	RT-PCR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
miR 146a	Microarray	1.56	0.54	0.49 2.63	0.004**	0.0%
	RT-PCR	3.48	1.35	0.84 6.12	0.010*	86.9%
miR 155	Microarray	-0.01	1.7	-3.34 3.32	0.995	88.1%
	RT-PCR	0.72	2.7	-4.57 6.01	0.79	91.4%
miR 210	Microarray	0.72	0.24	0.25 1.18	0.002**	9.8%
	RT-PCR	0.33	0.8	-1.23 1.89	0.681	87.9%
miR 223	Microarray	2.51	0.46	1.60 3.42	<0.001***	0.0%
	RT-PCR	4.73	3.09	-1.34 10.8	0.127	90.0%

Figure 16 : Liste des micro-ARN sélectionnés chez l'Homme pour la méta-analyse du niveau d'expression relatif chez les sujets atteints de parodontite en comparaison avec les sujets sains.

Valeur-p < 0,05 (106)

Les micro-ARN d'intérêt : miR-146a et miR-142-3p

Plusieurs études ont montré le rôle anti-inflammatoire de ces micro-ARN.

miR-146a a une action de rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation NF-kB dépendante des TLR qui résulte en une diminution des cytokines pro-inflammatoires : IL-1 β , IL-6 et TNF- α . Leur action consiste en l'inhibition de l'activité de protéines de la voie NF-kB : IRAK-1 et TRAF-6 (72) (107).

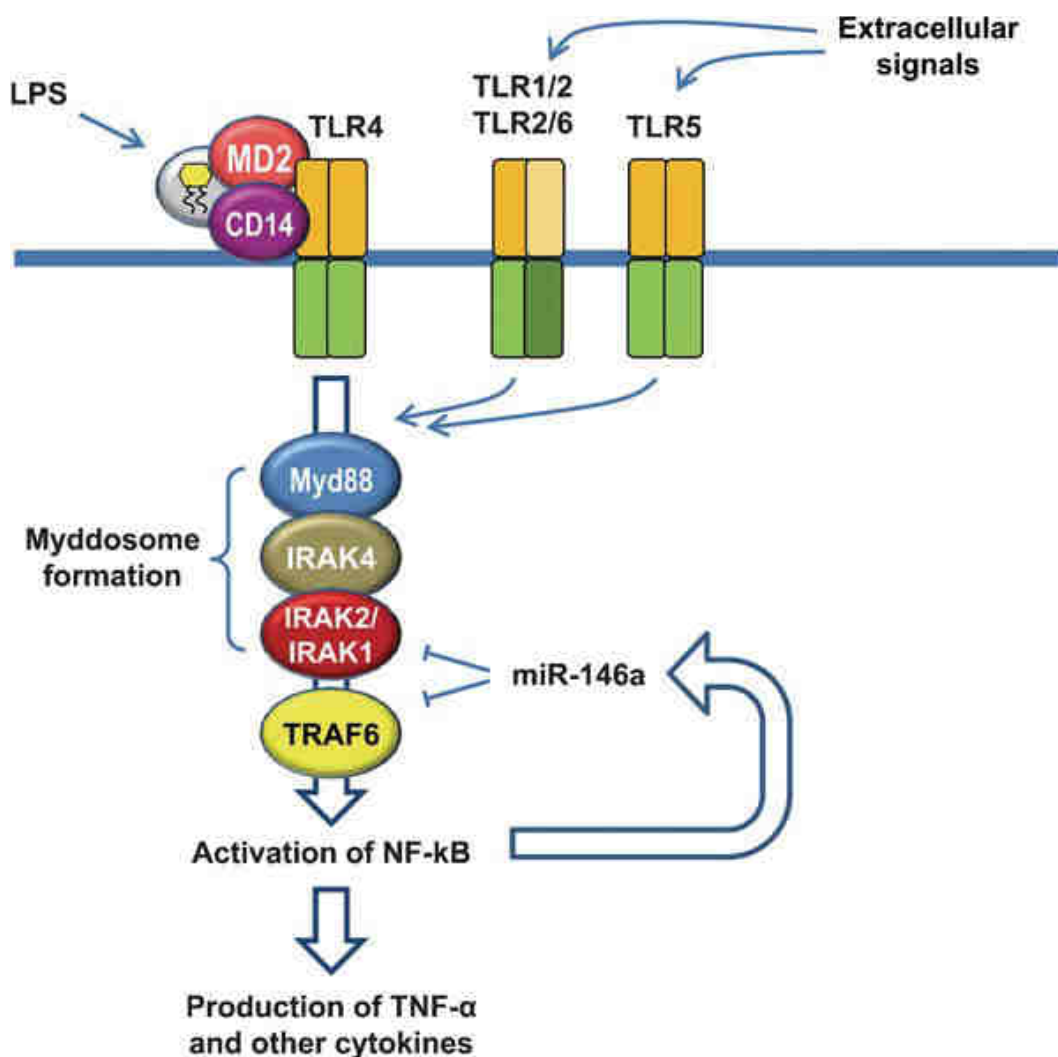


Figure 17 : Mécanisme d'action de miR-146a dans la voie NF-κB dépendante de TLR4 (108)

De plus, il est intéressant de noter que l'expression de ce micro-ARN est augmentée suite à l'exposition de fibroblastes aux LPS de *Porphyromona gingivalis* (93). Une corrélation intéressante a par ailleurs été établie entre la sévérité de la maladie parodontale et la concentration de miR-146a : l'expression du micro-ARN augmente avec la sévérité de la maladie. Une corrélation positive du même type a été établie entre l'inflammation gingivale et l'expression de miR-146a (109).

Le rôle de ce micro-ARN est par ailleurs présumé dans plusieurs maladies inflammatoires ou avec des composantes inflammatoires telles que : le syndrome coronarien aigu, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie d'Alzheimer, le diabète ou encore les désordres inflammatoires neurologiques. Une méta-analyse a montré la surexpression de miR-146a chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et a

établi une corrélation positive entre la concentration du micro-ARN et l'activité de la maladie (110).

Une étude tout-à-fait récente portant sur 53 patients a étudié l'utilisation de miR-146a en tant que biomarqueur (111). Les auteurs ont démontré l'augmentation de l'expression de miR-146a chez les patients atteints de parodontite, de diabète, ou de diabète et de parodontite à la fois. Les patients atteints à la fois de parodontite et de diabète présentent les quantités de miR-146a les plus élevées. Ces résultats corroborent les conclusions d'une autre étude similaire portant sur des patients atteints de diabète ou de diabète et de parodontite (112). Cette étude montre par ailleurs une réduction de l'expression de miR-146a 6 semaines après une lithotritie non chirurgicale.

Le rôle de miR-142-3p est également démontré dans différentes études. Son augmentation est en effet associée à une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-1 β (113) (114), en ciblant notamment SOCS-6 (115). Ce micro-ARN cible, par ailleurs, des protéines (IRAK-1) de la voie NF-kB des TLR-4. (116) Une autre étude montre son rôle dans l'inhibition de l'ostéoclastogenèse (117).

3. Le micro-ARN : un outil thérapeutique ? (118)

Les stratégies thérapeutiques autour de l'utilisation des micro-ARN reposent sur la régulation du profil d'expression des micro-ARN dérégulés. Leur dérégulation entraîne une diminution ou une augmentation de l'expression des gènes cibles, selon l'augmentation ou la diminution de ce micro-ARN. Ces stratégies laissent place à deux types de traitement :

- les thérapies de suppression : elles ont pour but d'augmenter l'expression des gènes cibles des micro-ARN (augmentés), en limitant l'action des micro-ARN sur l'ARNm cible ;
- les thérapies de remplacement : elles ont pour but de diminuer l'expression des gènes cibles des micro-ARN, en remplaçant les micro-ARN diminués.

a. Thérapie de suppression

La thérapie de suppression repose sur l'utilisation de molécules qui vont bloquer l'action des micro-ARN. À cet effet, plusieurs types de molécules ont été développées (figures 18-a et 18-b) :

- L'anti-miR : c'est un ARN monobrin ayant une spécificité pour le micro-ARN d'intérêt. Du fait de son défaut de stabilité, il est plutôt réservé à l'usage *in vitro*.
- L'antagomir : c'est un ARN monobrin similaire à l'anti-miR avec des modifications chimiques aux extrémités 3' et 5' afin d'améliorer sa stabilité. Il est complémentaire du micro-ARN d'intérêt. Sa stabilité améliorée lui octroie un usage *in vivo*.
- Le « masque-miR » : c'est un ARN monobrin qui se fixe sur la séquence de l'ARNm ciblée par le micro-ARN d'intérêt, afin d'empêcher la liaison du micro-ARN, le tout sans empêcher la traduction de l'ARNm.
- Le miR-éponge : c'est un plasmide dans lequel est encodé le code d'un ou plusieurs « ARN éponges » qui sont complémentaires d'un ou plusieurs micro-ARN.

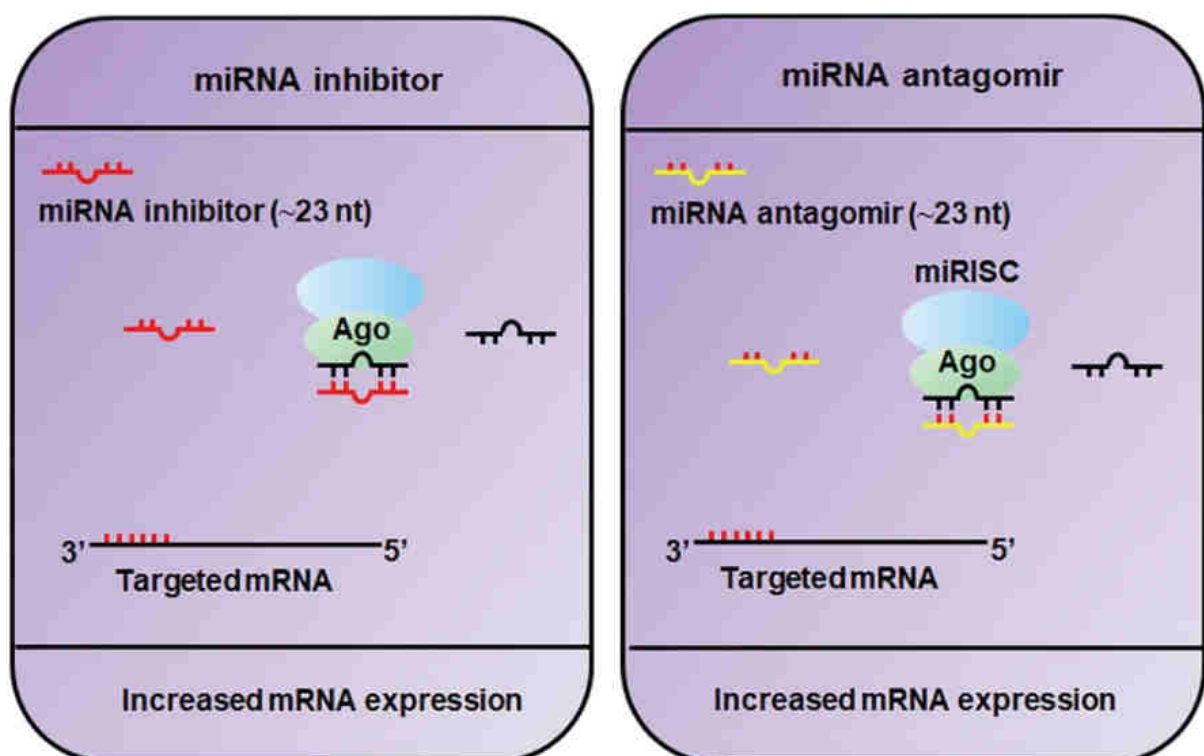


Figure 18-a : Les thérapies de suppression. À gauche : l'anti-miR. À droite : l'antagomir. (118)

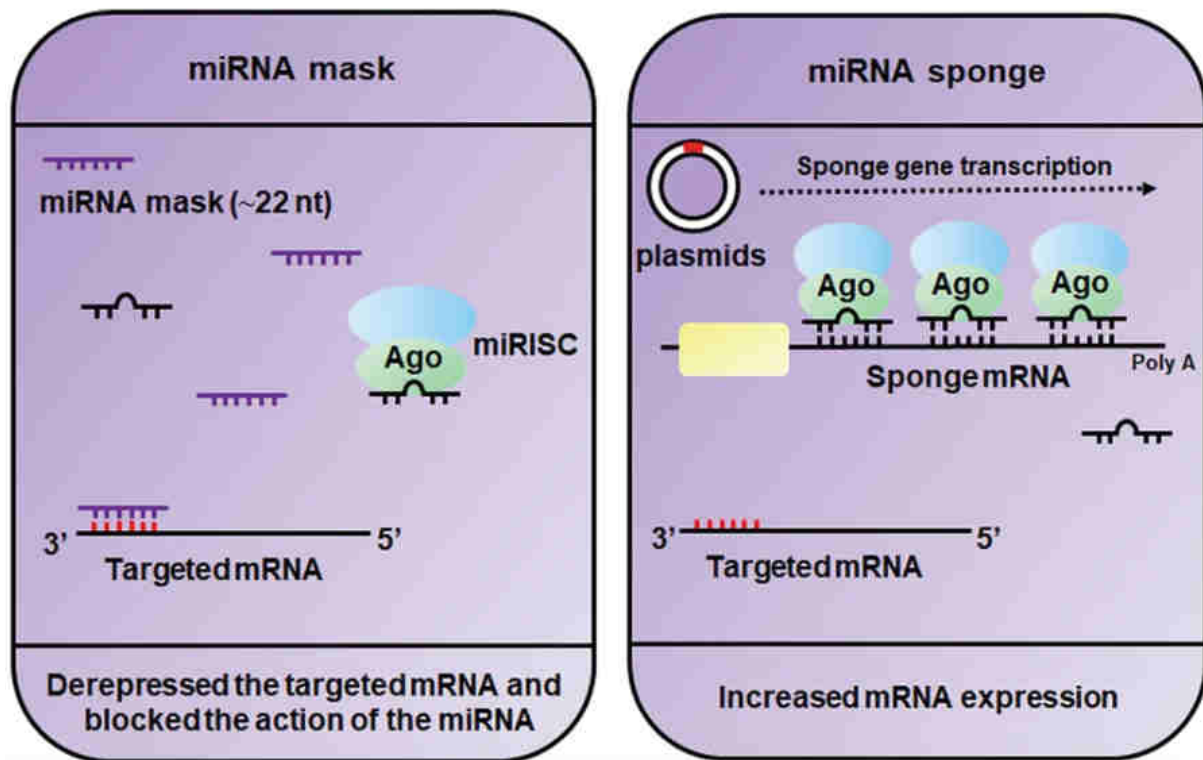


Figure 18-b : Les thérapies de suppression. À gauche : le masque-miR. À droite : le miR-éponge.
(118)

b. Thérapie de remplacement

Quatre types de molécules ont été développées pour la thérapie de remplacement (figures 19-a et 19-b) :

- Le miR-mime : c'est un ARN monobrin ayant une spécificité pour l'ARNm du micro-ARN d'intérêt, bloquant ainsi sa traduction.
- L'agomiR : c'est un ARN monobrin similaire au miR-mime ayant une complémentarité avec l'ARNm du micro-ARN d'intérêt. Comme l'antagomir, il présente des modifications à ses extrémités 3' et 5' pour améliorer sa stabilité pour les applications *in vivo*.
- Le pré-miR : c'est un ARN double brin qui sera coupé par l'enzyme Dicer afin de donner le micro-ARN d'intérêt.
- Le plasmide : fonctionne sur le même principe que les miR-éponges. Le plasmide présente les séquences d'encodage des micro-ARN d'intérêt.

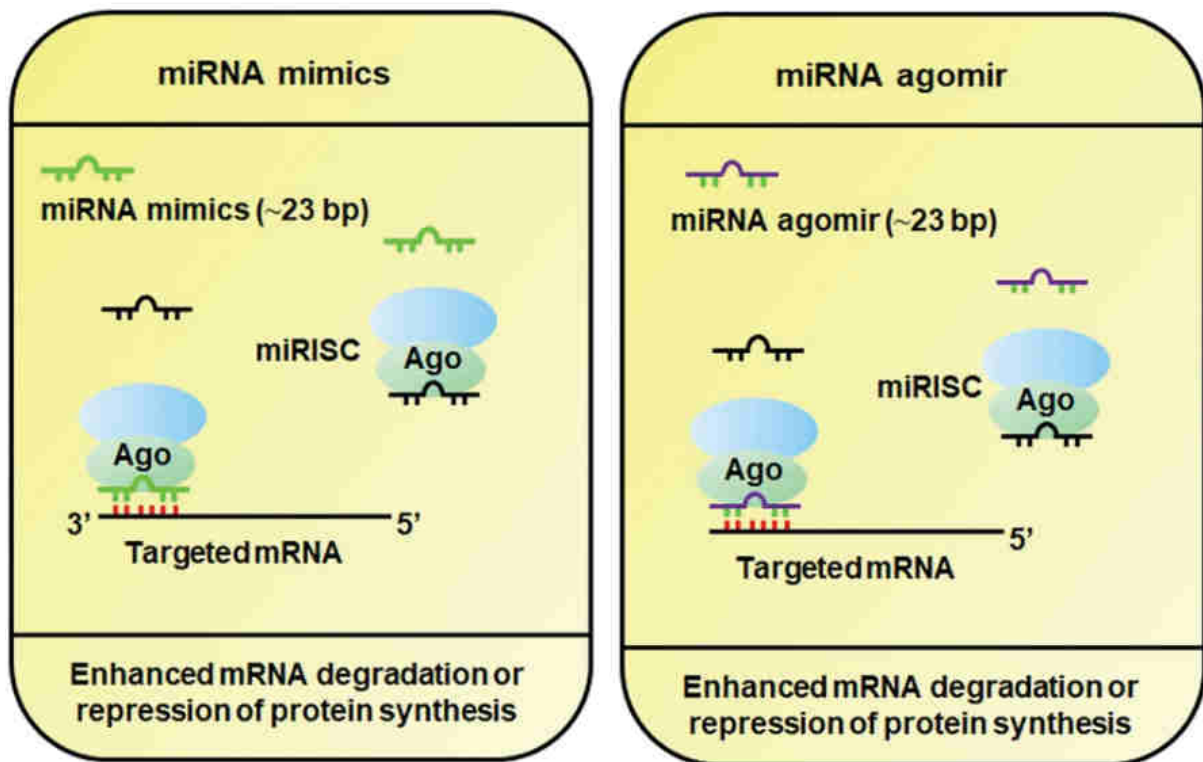


Figure 19-a : La thérapie de remplacement. À gauche : le miR-mime. À droite : l'agomiR. (118)

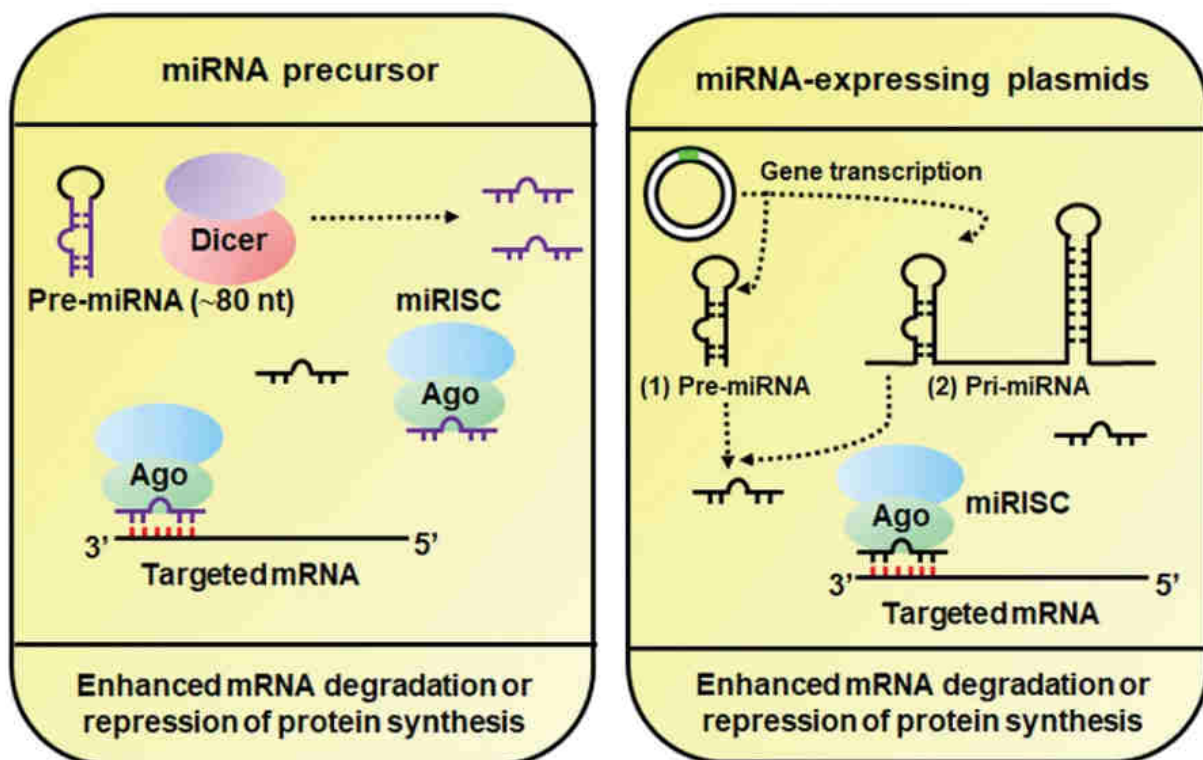


Figure 19-b : La thérapie de remplacement. À gauche : le pré-miR. À droite : le plasmide. (118)

Face à la stabilité parfois insuffisante des thérapeutiques à base de ribonucléotides (notamment en raison des RNAses), différents vecteurs sont utilisés pour améliorer leur acheminement jusqu'à leur cible. Il existe des vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus, etc.) mais qui, du fait de leur faible capacité de chargement, de leur potentiel toxique et de leur immunogénicité, présentent une efficacité limitée (119) (120). Les thérapies actuelles s'orientent donc plutôt vers des vecteurs non viraux issus de l'ingénierie des nanomatériaux et des vecteurs cellulaires (dérivés de membrane plasmique : exosomes, microvésicules, etc.).

Les objectifs de telles thérapeutiques cibleraient :

- d'une part, les voies de signalisation impliquées dans le métabolisme tissulaire en agissant sur l'ostéoclastogenèse et l'activité ostéoclastique, ainsi que sur la stimulation de l'ostéoblastogenèse ;
- et d'autre part, les voies de signalisations impliquées dans la réponse immunitaire afin de réduire les réponses inflammatoires exubérantes et améliorer la tolérance immunitaire.

À ce jour, il n'existe pas d'études thérapeutiques sur des modèles parodontaux. Cependant, des résultats intéressants sont obtenus dans des études *in vitro* et *in vivo* et pourraient servir de piste pour de futures études sur des modèles animaux.

c. Modulation de l'inflammation et de la résorption osseuse par injection de mime-miR-155 et d'anti-miR-2137

Une étude sur des modèles *in vitro* et *in vivo* de Huck et al. de 2017 (92) cherche à évaluer :

- l'influence de *Porphyromonas gingivalis* sur le profil d'expression des micro-ARN de macrophages issus de souris,
- le lien entre les micro-ARN dérégulés et l'expression de deux cytokines pro-inflammatoire (TNF- α) et anti-inflammatoire (IL-10) qui est modifiée suite à l'exposition à LPS de *Porphyromonas gingivalis* (121).

Parmi les micro-ARN dérégulés, quatre d'entre eux sont sélectionnés sur des paramètres statistiques et après analyse bio-informatique de leur interaction moléculaire : miR-155, miR-2137, miR-7674, miR-8109.

L'injection *in vitro* de mimes de miR-155 et d'anti-miR-2137 dans des macrophages exposés à *Porphyromonas gingivalis* montre respectivement une diminution de l'expression de TNF- α et une augmentation de IL-10 (figure 20).

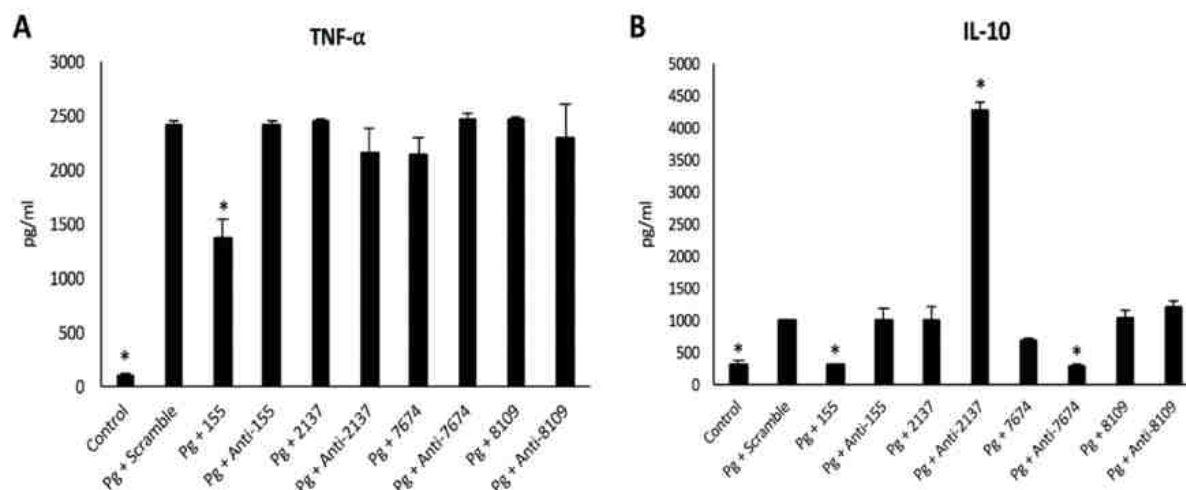


Figure 20 : Expression de TNF- α et IL-10 dans des macrophages murins exposés à *Porphyromonas gingivalis* suite à l'injection d'anti-miR et des miR-mimes (92)

L'injection de mimes-miR-155 et d'anti-miR-2137 est réalisée dans des crânes de souris au niveau de sites préalablement infectés par *Porphyromonas gingivalis*. L'influence sur la réponse inflammatoire et la résorption osseuse est évaluée par analyse histologique (figure 21) :

- l'injection séparée d'anti-miR-2137 et de mimes-miR-155 provoque une diminution (significative) de la taille des lésions osseuses,
- l'injection d'anti-miR-2137 provoque une diminution (significative) de l'infiltrat inflammatoire, de l'activité ostéoclastique et de l'indice de résorption osseuse.

Bien qu'il ne s'agisse pas de modèles parodontaux, ces résultats montrent le potentiel thérapeutique de l'usage des anti-miR et des mimes-miR dans le contrôle de la réponse inflammatoire et du métabolisme osseux.

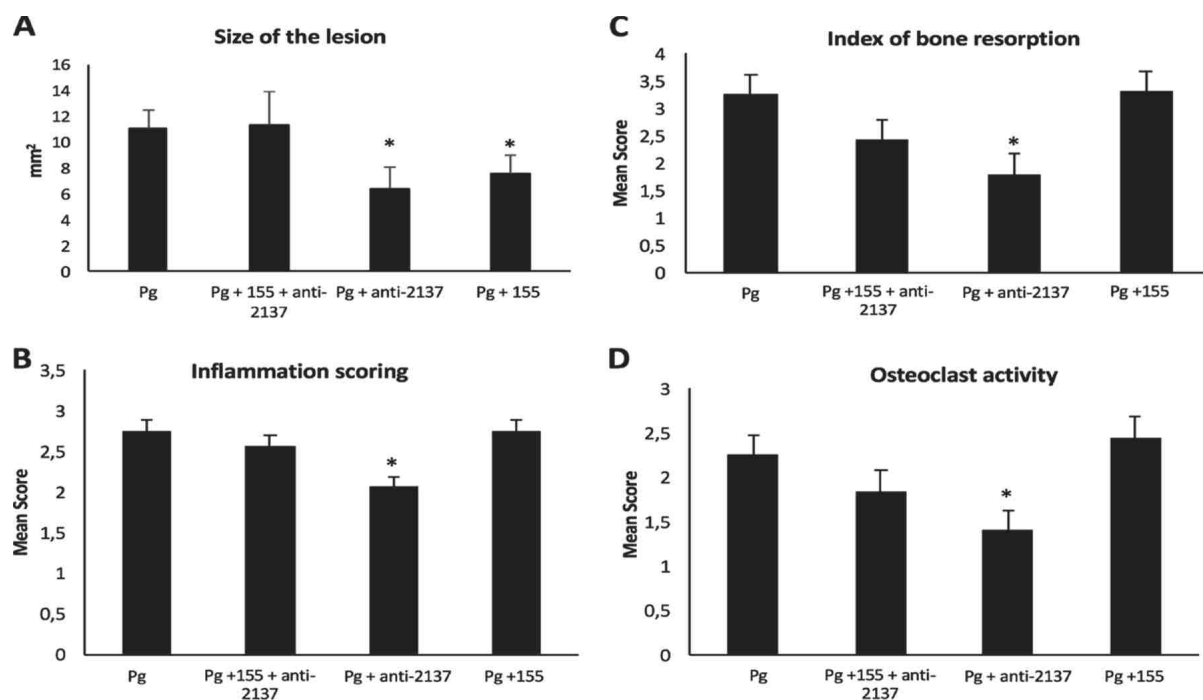


Figure 21 : Analyse de l'évolution des lésions et de l'inflammation basée sur les observations histologiques. A) Taille des lésions osseuses. B) Indice de résorption osseuse. C) Score inflammatoire. D) Activité ostéoclastique. (92)

4. Discussion

a. Les micro-ARN comme nouveaux biomarqueurs

L'une des principales limites de ces différentes études de profilage des micro-ARN réside dans l'inhomogénéité des méthodologies choisies par les auteurs qui est relative à deux choix techniques principaux :

- la méthode de détection des micro-ARN,
- la nature de prélèvement.

Milieus de prélèvement

Les études se basent sur différentes natures de prélèvements qu'on peut distinguer en prélèvements tissulaires/cellulaires et en prélèvements de fluides biologiques. Les prélèvements tissulaires/cellulaires rassemblent essentiellement les tissus gingivaux

et les cellules souches issues du ligament desmodontal. Les fluides biologiques comprennent essentiellement la salive, le fluide gingival crévulaire et le sérum. Il convient de déterminer quel milieu de prélèvement semble être le plus adapté et le plus révélateur de la situation parodontale.

Les liquides sanguin et plasmatique sont des fluides biologiques systémiques. Ils contiennent donc des micro-ARN circulants qui proviennent de différents organes et régions corporels. Ces fluides ne semblent donc pas être les plus pertinents pour analyser la santé parodontale notamment chez les patients atteints de plusieurs pathologies.

Biopsie gingivale

Dans les études comparatives, les prélèvements gingivaux sont réalisés de façon opportuniste sur des patients chez lesquels des chirurgies gingivales soustractives (élongation coronaire, chirurgie d'assainissement, etc.) sont indiquées.

Kebschull et Papanou (88) discutent de la pertinence de ce type de prélèvement quant au profil d'expression des micro-ARN. Pour les micro-ARN surexprimés, il est en effet difficile de déterminer si la surexpression est imputable à l'augmentation d'un ou plusieurs types cellulaires exprimant spontanément ces micro-ARN ou s'il s'agit effectivement d'une augmentation de la transcription de ces micro-ARN. Par exemple en cas d'inflammation, l'augmentation de certains micro-ARN reconnus dans des situations inflammatoires, tels que miR-146 ou miR-155, sont spontanément plus exprimés dans certains leucocytes tels que les PNN ou les macrophages (71).

Biopsie desmodontale

Dans les études comparatives, le prélèvement desmodontal est utilisé pour analyser le profil d'expression des micro-ARN dans les cellules souches desmodontales dans le but de comprendre les mécanismes qui sous-tendent le remaniement tissulaire. Comme pour la biopsie gingivale, ce prélèvement est réalisé de façon opportuniste lors d'extractions dentaires indiquées (dents avec atteintes parodontales non conservables, dents incluses ou en désinclusion, etc.).

Les biopsies gingivales et desmodontales, étant réalisables dans certaines situations précises, semblent poser une principale limite pour répondre aux objectifs des examens diagnostiques qui ont la prétention de couvrir des situations cliniques globales. Ces types de prélèvements trouvent cependant leur place dans la poursuite de la recherche dans le domaine pour l'identification de nouveaux micro-ARN et de leur rôle pathogénique.

Fluides biologiques : salive et fluide gingival

L'utilisation du fluide gingival ou de la salive pour le profilage des micro-ARN circulants est intéressant pour différentes raisons :

- les micro-ARN ont démontré une très bonne stabilité dans les fluides biologiques,
- les prélèvements sont non invasifs,
- la technicité du prélèvement est simple et rapide.

L'intérêt des micro-ARN circulants a été démontré dans d'autres disciplines médicales telles que la cancérologie dans le cadre du diagnostic ou du suivi thérapeutique.

La limite principale posée par le prélèvement des fluides biologiques est qu'ils ne contiennent pas les mêmes micro-ARN et les proportions de micro-ARN peuvent être différentes d'un fluide à l'autre.

Par ailleurs, certains micro-ARN ont montré des profils d'expression similaires dans la salive, le fluide gingival crévulaire et le sérum (en comparaison avec les prélèvements tissulaires) des patients atteints de parodontites, notamment miR-146a et miR-155.

La salive contenant plusieurs molécules et protéines provenant de toute la cavité buccale et pas seulement du parodonte semble être moins précise et moins représentative de la santé parodontale par rapport au fluide gingival. Une étude a identifié plus de 600 micro-ARN présents dans le fluide gingival. (122)

L'utilisation des fluides biologiques semble être plus adaptée et plus abordable que les prélèvements tissulaires

Méthode de détection des micro-ARN (123)

Comme précisé précédemment, le profilage des micro-ARN dans les études parodontales s'effectue principalement par RT-PCR et par *microarray*. Chacune de ces deux méthodes présentent ses avantages.

Le *microarray* permet une analyse simultanée de plusieurs centaines de micro-ARN. Ils permettent de plus de détecter des micro-ARN de séquences très proches. Il n'y a pas de nécessité d'amplification et de clonage. Le rendement est cependant plus faible pour les micro-ARN circulants que pour les micro-ARN tissulaires. Ils ne sont pas bien adaptés pour l'analyse quantitative. Ils présentent cependant un faible coût de réalisation par rapport à la RT-PCR. Cette méthode servira essentiellement à faire un « monitoring » des micro-ARN présents dans l'échantillon plutôt qu'une quantification rigoureuse.

La RT-PCR est considérée historiquement comme le « Gold Standard » de la détection des micro-ARN et de leur quantification. Elle est notamment favorisée pour sa facilité d'utilisation. Initialement, elle ne permettait la détection que de quelques micro-ARN ; mais avec le développement de nouvelles plateformes, la RT-PCR permet de détecter plusieurs centaines de micro-ARN simultanément. Une des difficultés réside dans la répllication du micro-ARN en ADNc étant donnée la faible longueur des micro-ARN et l'absence de séquence spécifique (queue poly-adénylée) permettant l'utilisation d'amorces classiques. La répllication doit se faire en utilisant des amorces particulières.

Une autre méthode peu utilisée, en raison de son coût très important et de sa technicité d'analyse bio-informatique, est le séquençage de nouvelle génération. C'est une méthode très sensible permettant non seulement de détecter une plage de micro-ARN encore plus importante que le *microarray* mais aussi de discriminer les différents isomiR et de découvrir de nouveaux micro-ARN.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des méthodes de détection des micro-ARN (123)

Méthode	Microarray	RT-PCR	NGS
Sensibilité	Moyenne	Excellente	Bonne
Domaine de mesure	Moyen	Très large	Large
Dosage de nouveaux micro-ARN	Non	Non	Oui
Praticabilité	Facile	Facile	Difficile
Coût	Faible	Elevé	Très élevé

Actuellement, l'utilisation du séquençage de nouvelle génération (NGS pour « *next-generation sequencing* ») est marginale voire inexistante en parodontologie. Vraisemblablement, en raison de son coût important et de son apport limité à ce stade, son utilisation systématique semble superflue.

Indépendamment des méthodes de détection utilisées, il existe plusieurs méthodes d'extraction des micro-ARN et plusieurs kits commerciaux, ce qui peut être à l'origine de différences dans les quantités de micro-ARN extraits.

La stabilité des micro-ARN est globalement bonne. Néanmoins, pour ce qui est des micro-ARN circulants, ceux-ci ne sont pas exposés au même risque de dégradation par les RNAses. En effet, les micro-ARN présents dans les vésicules sont mieux protégés vis-à-vis des RNAses par rapport aux micro-ARN présent sous forme libres. Ainsi, le profil de certains micro-ARN pourrait être sous-évalué, voire certains micro-ARN pourraient même ne pas être détectés.

Critères de sélection des patients et qualité des études

Les critères de sélection des patients varient d'une étude à l'autre sur différents points et notamment pour la constitution des groupes de patients atteints de parodontite et les patients sains. En effet, les seuils des pertes d'attache ou des profondeurs de poches varient d'un auteur à l'autre. Par ailleurs, beaucoup d'études menées jusqu'alors ne présentent pas de groupe contrôle, ceci ne permettant pas d'apporter une significativité aux résultats.

La méta-analyse proposée par Farah et al. (106) tend à gommer certaines limites telles que la faible taille des échantillons. Cependant certaines différences, comme le choix de la méthode de prélèvement, n'ont pas pu être résolues. Par ailleurs, les auteurs de la méta-analyse sont critiques sur la qualité des études sélectionnées, parmi lesquelles (28 études au total) 6 d'entre elles présentent un risque de biais élevé, 14 présentent un risque de biais incertain et seules 8 présentent un risque de biais faible.

Conclusions de la méta-analyse

Les auteurs de la méta-analyse sur les micro-ARN dérégulés dans les parodontites concluent que les micro-ARN miR-146a et miR-142-3p peuvent servir de biomarqueurs du fait de leur validation à la fois par *microarray* et par PCR. Cependant, cela n'exclut pas l'intérêt des autres micro-ARN dérégulés de façon significative par *microarray* et pour lesquels une détection par PCR n'a pas été réalisée : miR-24-3p, miR-30e, miR-130a, miR-144. Par ailleurs miR-210 et miR-223 n'ont montré de résultat significatif que par *microarray*. Un autre micro-ARN, miR-155, n'a étonnamment pas montré de différence significative dans son profil d'expression alors qu'une étude récente d'août 2020 (111) (postérieure à la méta-analyse) menée chez une cinquantaine de patients confirme sa surexpression chez les patients atteints de parodontite ou de parodontite et de diabète ; ces résultats rejoignent d'ailleurs ceux obtenus par l'équipe de Radovic et al. en 2018 (112) sur les mêmes types de patients. Bien que cette méta-analyse, pionnière, apporte des informations intéressantes et renforce des résultats connus pour miR-146a, il convient d'aborder ses conclusions avec une certaine retenue notamment en raison de la disparité méthodologique entre les différentes études incluses.

Par ailleurs, les auteurs concluent que le *microarray* serait une méthode plus sensible que la RT-PCR, ce qui se heurte aux conclusions opposées communément admises dans d'autres publications.

Nous proposons, ci-dessous, une liste des micro-ARN ayant une potentielle utilisation en tant que biomarqueurs et dont la reproductibilité de la dérégulation est la plus largement vérifiée, sur la base de la méta-analyse et des résultats les plus récents décrits dans ce travail (tableau 3). Une mention « NC » (non connue) accompagne les micro-ARN pour lesquels des recherches complémentaires sont nécessaires quant à leur rôle dans les maladies parodontales

Tableau 3 : Les micro-ARN d'intérêt en tant que potentiels biomarqueurs

Micro-ARN	Profil d'expression	Fonction	Effet en condition physiopathologique
miR-24-3p	diminué	NC	NC
miR-30e	augmenté	- inhibition de l'activité des cellules NK - inhibition de la production d'IFN-γ et de TNF-α	anti-inflammatoire
miR-130a	augmenté	- possible rôle dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes(124)	alvéolyse
miR-142-3p	augmenté	- inhibition de la production de cytokines - inhibition de la voie NF-kB des TLR-4	anti-inflammatoire
miR-144	augmenté	NC	
miR-146a	augmenté	- inhibition de l'activité des voies NF-kB - inhibiteurs des voies de différenciation des ostéoclastes - stimulation de la différenciation des ostéoblastes	anti-inflammatoire
miR-155	augmenté	- stimulation des cellules NK - augmentation de la sensibilité des TLR au leucotriène B4 - stimulation de la production de NF-kB, TNF-α, IFN-β - maintien de l'activité des lymphocytes Th17 - inhibition de la polarisation des lymphocytes en Th2 - rétrocontrôle négatif des voies de différenciation des ostéoclastes - limitation de la différenciation des ostéoblastes	pro-inflammatoire / anti-inflammatoire

miR-210	diminué	- inhibition de la différenciation des Ltreg	pro-inflammatoire
miR-223	augmenté	- inhibiteurs des voies de différenciation des ostéoclastes - limite l'activité inflammatoire des PNN et des macrophages (125)	anti-inflammatoire

L'utilisation des micro-ARN en tant que biomarqueurs dans le domaine médical

Plusieurs tests diagnostiques développés ont été commercialisés pour diverses pathologies telles que les cancers, les pathologies hépatiques ou encore les pathologies cardiaques (126). Les tests diagnostiques existant notamment en cancérologie ont pour objectifs de discriminer les différentes catégories de cancer, et sont basés sur des signatures de micro-ARN dérégulés afin de personnaliser les thérapeutiques en fonction des patients en déterminant celle qui serait la plus adaptée, par exemple : le test diagnostique miR-view® lung (127). Cependant, les tests diagnostiques de micro-ARN en sont à leurs débuts et ne s'imposent pas encore dans les protocoles de prise en charge des patients (128).

b. Les micro-ARN comme thérapie novatrice

L'introduction de telles thérapeutiques en parodontologie devra répondre à trois principaux défis :

- Utiliser des formes thérapeutiques suffisamment stables jusqu'à leurs arrivées sur leurs sites d'action ;
- Développer une forme médicamenteuse capable d'être acheminée jusqu'à son site d'action ;
- Agir sur des cellules cibles sans perturber l'activité normale des autres cellules.

Dans le domaine médical, plusieurs traitements sont en cours de développement pour diverses pathologies, utilisés en essais cliniques, et pourraient à nouveau servir de pistes pour la parodontologie. Néanmoins, à ce jour, aucun essai clinique n'est passé en phase 3 ; plusieurs essais cliniques ont notamment été arrêtés en raison d'effets indésirables (129).

c. Quelle place et quel intérêt des micro-ARN dans la pratique de la parodontologie ?

Le rôle des micro-ARN dans l'homéostasie parodontale et dans sa rupture a été démontré et les prochaines études qui paraîtront, et qui sont de plus en plus nombreuses ces dernières années, apporteront des éléments et des résultats supplémentaires.

Le diagnostic de la maladie parodontale, à ce jour, repose essentiellement sur le sondage et les examens radiologiques. Les paramètres cliniques déterminés grâce aux outils diagnostics actuels ne permettent pas d'évaluer l'activité de la maladie, son pronostic, sa prédictibilité d'évolution et son diagnostic précoce permettant d'identifier de nouvelles classes de patients à risques. Les éléments apportés par les différentes études sur les micro-ARN sont néanmoins intéressants et laissent à penser qu'ils pourraient intégrer un jour les outils diagnostics afin de combler ces lacunes.

L'utilisation des micro-ARN dans un but thérapeutique est encore liminaire à ce jour. Les thérapeutiques consisteraient à agir sur les voies de signalisation dérégulées, impliquées notamment dans le métabolisme tissulaire et dans la réponse immunitaire. La maladie parodontale impliquant une multitude de voies de signalisation et de types cellulaires, de telles thérapies s'intégreraient conjointement aux thérapeutiques actuelles.

La mise en place de tels outils diagnostiques et thérapeutiques novateurs dans la pratique parodontale pose nécessairement la question de leur intérêt et de leur plus-value, par rapport aux outils actuels, qui restent à être démontrés.

Conclusions

Les micro-ARN se présentent comme des acteurs majeurs des mécanismes de régulation épigénétique. Ces molécules ubiquitaires sont capables de participer à l'orchestration de la plupart des processus biologiques de l'organisme en modulant finement l'expression d'une multitude de gènes.

Ils participent au maintien de l'homéostasie des tissus parodontaux en régulant de nombreuses voies de signalisation impliquées notamment dans le métabolisme tissulaire et la réponse immunitaire. Ils sont dérégulés dans les maladies parodontales et permettent de comprendre de façon plus approfondie les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la dynamique de la maladie. Par ailleurs, les bactéries parodontopathogènes sont capables de modifier l'expression des micro-ARN qui pourraient alors servir de molécules clés dans le détournement de la réponse de l'hôte par les bactéries.

Le profil d'expression des micro-ARN reflète la santé du parodonte. Ainsi, l'analyse de leur profil d'expression pourrait constituer une façon innovante de diagnostiquer les maladies parodontales. Les micro-ARN pourraient alors s'établir comme une nouvelle classe de biomarqueurs venant répondre aux limites des biomarqueurs actuels dont le recours clinique est restreint. Nous avons montré dans ce travail que plusieurs micro-ARN sont dérégulés de façon récurrente chez les patients atteints de maladie parodontale en comparaison avec les patients sains. Ces micro-ARN pourraient un jour s'intégrer aux outils diagnostiques actuels en parodontologie. Bien que les différentes études présentent des méthodologies et des protocoles différents, des candidats biomarqueurs émergent, tel miR-146a. Alors que les micro-ARN semblent être associés à l'activité de la maladie parodontale, leur intérêt dans le diagnostic précoce, la susceptibilité à la maladie et le pronostic n'a pas encore été suffisamment étudié.

Concernant les stratégies thérapeutiques autour de ces molécules, à ce jour aucune étude sur modèle parodontal n'existe. Il est donc encore précoce de situer leur place dans la pratique clinique. Cependant, des axes de recherche pertinents ressortent de ces études préliminaires. La recherche autour des micro-ARN étant très active dans les autres disciplines médicales et s'étant significativement développée ces toutes

récentes années en parodontologie, il est fort probable que de nouveaux résultats plus aboutis et plus concrets apparaissent à l'avenir.

En définitive, les micro-ARN offrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes pathogéniques des maladies parodontales, leur diagnostic et leur traitement.

SIGNATURE DES CONCLUSIONS

Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

Nom - prénom de l'impétrant : JAFARI Amine

Titre de la thèse : Rôle des micro-ARN dans l'homéostasie parodontale et applications cliniques : une revue de la littérature

Directeur de thèse : Professeur Olivier HUCK

VU

Strasbourg, le : **14 DEC. 2020**
Le Président du Jury,

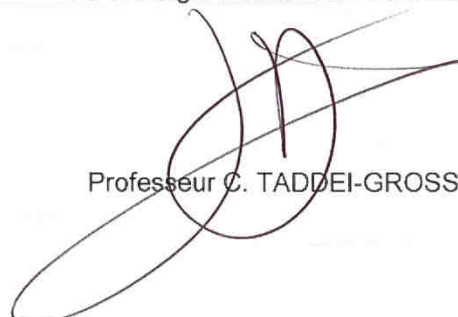


Professeur O. HUCK

VU

17 DEC. 2020

Strasbourg, le :
Le Doyen de la Faculté
de Chirurgie Dentaire de Strasbourg,



Professeur C. TADDEI-GROSS

Références bibliographiques

1. Dyke TEV, Dave S. Risk Factors for Periodontitis. J Int Acad Periodontol. janv 2005;7(1):3.
2. Marsh PD. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. Caries Res. 2004;38(3):204-11.
3. Newman MG, Grinenco V, Weiner M, Angel I, Karge H, Nisengard R. Predominant Microbiota Associated with Periodontal Health in the Aged. J Periodontol. nov 1978;49(11):553-9.
4. Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG. Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. Ann N Y Acad Sci. mars 2007;1098:504-9.
5. Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M. Microbiologie en odonto-stomatologie. Paris: Maloine; 2006.
6. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol. avr 1992;63(4 Suppl):322-31.
7. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control: Plaque biofilms and communities. Periodontol 2000. févr 2011;55(1):16-35.
8. Diaz R, Ghofaily LA, Patel J, Balashova NV, Freitas AC, Labib I, et al. Characterization of leukotoxin from a clinical strain of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Microb Pathog. févr 2006;40(2):48-55.
9. Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. Oral Microbiol Immunol. févr 2009;24(1):69-75.
10. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Co-adhesion of oral microbial pairs under flow in the presence of saliva and lactose. J Dent Res. févr 1996;75(2):809-15.
11. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Annu Rev Microbiol. 1996;50:513-52.
12. Cisar JO, Sandberg AL, Reddy GP, Abeygunawardana C, Bush CA. Structural and antigenic types of cell wall polysaccharides from viridans group streptococci with receptors for oral actinomyces and streptococcal lectins. Infect Immun. déc 1997;65(12):5035-41.
13. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res. juin 2004;38(3):204-11.
14. Bouchard P, Brochery B, Feghali M, Jaumet V, Kerner S, Korngold S, et al. Parodontologie & dentisterie implantaire. Volume 1, Volume 1,. 2015.
15. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000.

2005;38(1):135-87.

16. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, et al. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* mai 1998;25(5):346-53.
17. Van der Weijden GA, Timmerman MF, Reijerse E, Wolffe GN, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U. The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol.* oct 1994;21(9):583-8.
18. Andrian E, Mostefaoui Y, Rouabhia M, Grenier D. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by *Porphyromonas gingivalis* in an engineered human oral mucosa model. *J Cell Physiol.* avr 2007;211(1):56-62.
19. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *J Dent Res.* mai 2006;85(5):392-403.
20. Huck O, Elkaim R, Davideau J-L, Tenenbaum H. *Porphyromonas gingivalis*-impaired innate immune response via NLRP3 proteolysis in endothelial cells. *Innate Immun.* janv 2015;21(1):65-72.
21. Colombo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, Paster BJ, Smith CM, Cugini MA, et al. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* févr 1998;25(2):169-80.
22. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* févr 1998;25(2):134-44.
23. Immunité du parodonte - EM consulte [Internet]. [cité 11 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1098248/immunité-du-parodonte>
24. Pierrard L, braux julien, Chatté F, Jourdain M, Svoboda J-M. Étiopathogénie des maladies parodontales. EMC - Médecine. 1 janv 2015;
25. Dixon DR, Bainbridge BW, Darveau RP. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontol 2000.* 2004;35(1):53-74.
26. Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* juin 1997;14:54-78.
27. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med.* 2013;15:e7.
28. Schaefer B, Sun W, Li Y-S, Fang L, Chen W. The evolution of posttranscriptional regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* sept 2018;9(5):e1485.
29. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 23 janv 2004;116(2):281-97.

30. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* janv 2009;19(1):92-105.
31. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 19 févr 1998;391(6669):806-11.
32. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 3 déc 1993;75(5):843-54.
33. Johnson TE, Mitchell DH, Kline S, Kemal R, Foy J. Arresting development arrests aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* 1 nov 1984;28(1):23-40.
34. Ruvkun G, Ambros V, Coulson A, Waterston R, Sulston J, Horvitz HR. Molecular genetics of the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14*. *Genetics.* mars 1989;121(3):501-16.
35. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 3 déc 1993;75(5):855-62.
36. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol [Internet].* 3 août 2018 [cité 11 nov 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6085463/>
37. Yang S, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell.* 16 sept 2011;43(6):892-903.
38. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res.* oct 2004;14(10a):1902-10.
39. de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol.* sept 2017;35(9):872-8.
40. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 13 oct 2004;23(20):4051-60.
41. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* déc 2006;13(12):1097-101.
42. Lee Y, Hur I, Park S-Y, Kim Y-K, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 8 févr 2006;25(3):522-32.
43. Kim JK, Kim TS, Basu J, Jo E-K. MicroRNA in innate immunity and autophagy during mycobacterial infection. *Cell Microbiol.* 2017;19(1):e12687.
44. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform

- system for microRNA annotation. *RNA* N Y N. mars 2003;9(3):277-9.
45. Kasashima K, Nakamura Y, Kozu T. Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 17 sept 2004;322(2):403-10.
 46. Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou Y, Lai EC. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol*. avr 2008;15(4):354-63.
 47. Ghildiyal M, Xu J, Seitz H, Weng Z, Zamore PD. Sorting of Drosophila small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA*. 1 janv 2010;16(1):43-56.
 48. Ipsaro JJ, Joshua-Tor L. From Guide to Target: Molecular Insights into Eukaryotic RNAi Machinery. *Nat Struct Mol Biol*. janv 2015;22(1):20-8.
 49. Xu W, San Lucas A, Wang Z, Liu Y. Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*. 2014;15 Suppl 7:S4.
 50. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*. juill 2015;16(7):421-33.
 51. Jo MH, Shin S, Jung S-R, Kim E, Song J-J, Hohng S. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol Cell*. 2 juill 2015;59(1):117-24.
 52. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*. 15 juill 2006;20(14):1885-98.
 53. Braun JE, Truffault V, Boland A, Huntzinger E, Chang C-T, Haas G, et al. A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat Struct Mol Biol*. déc 2012;19(12):1324-31.
 54. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 15 déc 1999;216(2):671-80.
 55. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 nov 2005;102(47):16961-6.
 56. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. juill 2005;7(7):719-23.
 57. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*. juin 2005;7(6):633-6.
 58. Lawrie CH, éditeur. *MicroRNAs in medicine*. Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell; 2014. 702 p.

59. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Curr Biol.* 30 avr 2002;12(9):735-9.
60. Lewis BP, Shih I -hung, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 26 déc 2003;115(7):787-98.
61. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* oct 2010;101(10):2087-92.
62. Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DSB. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin Chem.* janv 2011;57(1):84-91.
63. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science.* 21 déc 2007;318(5858):1931-4.
64. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* juill 2004;5(7):522-31.
65. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1 mai 2011;1812(5):592-601.
66. Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem.* 26 janv 2007;282(4):2130-4.
67. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell.* mars 2008;13(3):272-86.
68. Yang X, Feng M, Jiang X, Wu Z, Li Z, Aau M, et al. miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes Dev.* 15 oct 2009;23(20):2388-93.
69. Ichimura A, Ruike Y, Terasawa K, Tsujimoto G. miRNAs and regulation of cell signaling. *FEBS J.* 2011;278(10):1610-8.
70. Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* avr 2010;11(4):252-63.
71. Kumar Kingsley SM, Vishnu Bhat B. Role of MicroRNAs in the development and function of innate immune cells. *Int Rev Immunol.* 04 2017;36(3):154-75.
72. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 août 2006;103(33):12481-6.

73. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 janv 2007;104(5):1604-9.
74. Tili E, Michaille J-J, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 oct 2007;179(8):5082-9.
75. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*. avr 2008;9(4):405-14.
76. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA Regulation of Inflammatory Responses. *Annu Rev Immunol*. 2012;30(1):295-312.
77. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1:15004.
78. Zhou S, Jin J, Wang J, Zhang Z, Freedman JH, Zheng Y, et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin*. juill 2018;39(7):1073-84.
79. Mi S, Zhang J, Zhang W, Huang RS. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Inflammatory Diseases. *MicroRNA*. 2013;2(1):64-72.
80. Long H, Wang X, Chen Y, Wang L, Zhao M, Lu Q. Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: Pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets. *Cancer Lett*. 01 2018;428:90-103.
81. Drury RE, O'Connor D, Pollard AJ. The Clinical Application of MicroRNAs in Infectious Disease. *Front Immunol*. 2017;8:1182.
82. Shah P, Cho SK, Thulstrup PW, Bjerrum MJ, Lee PH, Kang J-H, et al. MicroRNA Biomarkers in Neurodegenerative Diseases and Emerging NanoSensors Technology. *J Mov Disord*. janv 2017;10(1):18-28.
83. Staedel C, Darfeuille F. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol*. 2013;15(9):1496-507.
84. Zhou X, Li X, Wu M. miRNAs reshape immunity and inflammatory responses in bacterial infection. *Signal Transduct Target Ther*. 25 mai 2018;3(1):1-13.
85. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol 2000*. juin 2020;83(1):26-39.
86. Furer V, Greenberg JD, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 1 juill 2010;136(1):1-15.
87. Murata K, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Ito H, et al. MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. *Arthritis Rheumatol*

Hoboken NJ. mars 2014;66(3):549-59.

88. Kebschull M, Papapanou PN. Mini but mighty: microRNAs in the pathobiology of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2015;69(1):201-20.
89. Luan X, Zhou X, Trombetta-eSilva J, Francis M, Gaharwar AK, Atsawasuwana P, et al. MicroRNAs and Periodontal Homeostasis. *J Dent Res*. mai 2017;96(5):491-500.
90. Luan X, Zhou X, Naqvi A, Francis M, Foyle D, Nares S, et al. MicroRNAs and immunity in periodontal health and disease. *Int J Oral Sci*. 6 août 2018;10(3):1-14.
91. Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, Hammond SM, Reiner SL. Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. janv 2010;40(1):225-31.
92. Huck O, Al-Hashemi J, Poidevin L, Poch O, Davideau J-L, Tenenbaum H, et al. Identification and Characterization of MicroRNA Differentially Expressed in Macrophages Exposed to *Porphyromonas gingivalis* Infection. *Infect Immun* [Internet]. 23 févr 2017 [cité 11 nov 2020];85(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328478/>
93. Olsen I, Singhrao SK, Osmundsen H. Periodontitis, pathogenesis and progression: miRNA-mediated cellular responses to *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Microbiol*. 2017;9(1):1333396.
94. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. nov 2010;56(11):1733-41.
95. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG, Karlsson JM, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 19 janv 2012;119(3):756-66.
96. Meckes DG, Shair KHY, Marquitz AR, Kung C-P, Edwards RH, Raab-Traub N. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 nov 2010;107(47):20370-5.
97. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS One*. 2008;3(11):e3694.
98. Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Itoh Y, Ohtsuki Y, et al. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. févr 2011;19(2):395-9.
99. Zerneck A, Bidzhikov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 8 déc 2009;2(100):ra81.
100. Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity.

Nat Cell Biol. sept 2009;11(9):1143-9.

101. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 22 mars 2011;108(12):5003-8.
102. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins [Internet]. *Nature Cell Biology.* 2011 [cité 11 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.meta.org/papers/micrnas-are-transported-in-plasma-and-delivered/21423178>
103. Beylerli O, Beeraka NM, Gareev I, Pavlov V, Yang G, Liang Y, et al. MiRNAs as Noninvasive Biomarkers and Therapeutic Agents of Pituitary Adenomas. *Int J Mol Sci.* janv 2020;21(19):7287.
104. Stathopoulou PG, Buduneli N, Kinane DF. Systemic Biomarkers for Periodontitis. *Curr Oral Health Rep.* 1 déc 2015;2(4):218-26.
105. Schmalz G, Li S, Burkhardt R, Rinke S, Krause F, Haak R, et al. MicroRNAs as Salivary Markers for Periodontal Diseases: A New Diagnostic Approach? *BioMed Res Int.* 2016;2016:1027525.
106. Asa'ad F, Garaicoa-Pazmiño C, Dahlin C, Larsson L. Expression of MicroRNAs in Periodontal and Peri-Implant Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 10 juin 2020;21(11):4147.
107. Hou J, Wang P, Lin L, Liu X, Ma F, An H, et al. MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol.* 1 août 2009;183(3):2150-8.
108. Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol.* sept 2011;8(5):388-403.
109. Gao Y, Hao C. [Expression of miR-146a in saliva of chronic periodontitis patients and its influence on gingival crevicular inflammation and MMP-8/TIMP-1 levels]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue Shanghai J Stomatol.* juin 2018;27(3):309-12.
110. Bae S-C, Lee YH. MiR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *Int J Rheum Dis.* juill 2018;21(7):1335-42.
111. Al-Rawi NH, Al-Marzooq F, Al-Nuaimi AS, Hachim MY, Hamoudi R. Salivary microRNA 155, 146a/b and 203: A pilot study for potentially non-invasive diagnostic biomarkers of periodontitis and diabetes mellitus. *Ojcius DM, éditeur. PLOS ONE.* 5 août 2020;15(8):e0237004.
112. Radović N, Nikolić Jakoba N, Petrović N, Milosavljević A, Brković B, Roganović J. MicroRNA-146a and microRNA-155 as novel crevicular fluid biomarkers for periodontitis in non-diabetic and type 2 diabetic patients. *J Clin Periodontol.* juin 2018;45(6):663-71.
113. Fordham JB, Naqvi AR, Nares S. Regulation of miR-24, miR-30b, and miR-142-

- 3p during macrophage and dendritic cell differentiation potentiates innate immunity. *J Leukoc Biol.* août 2015;98(2):195-207.
114. Naqvi AR, Fordham JB, Nares S. miR-24, miR-30b, and miR-142-3p regulate phagocytosis in myeloid inflammatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 févr 2015;194(4):1916-27.
 115. Chen H, Lan Z, Li Q, Li Y. Abnormal expression of long noncoding RNA FGD5-AS1 affects the development of periodontitis through regulating miR-142-3p/SOCS6/NF- κ B pathway. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 4 déc 2019;47(1):2098-106.
 116. Hu H-Y, Wang J-Q. [MiR-142-3p inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human periodontal ligament cells through targeting IRAK1]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue Shanghai J Stomatol.* déc 2016;25(6):682-7.
 117. Fordham JB, Guilfoyle K, Naqvi AR, Nares S. MiR-142-3p is a RANKL-dependent inducer of cell death in osteoclasts. *Sci Rep.* avr 2016;6(1):24980.
 118. Fu Y, Chen J, Huang Z. Recent progress in microRNA-based delivery systems for the treatment of human disease. *ExRNA.* déc 2019;1(1):24.
 119. Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 28 déc 2013;172(3):962-74.
 120. Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1 févr 2016;98:12-23.
 121. Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable Cell Responses to *P. gingivalis* Lipopolysaccharide: *J Dent Res* [Internet]. 4 sept 2009 [cité 2 déc 2020]; Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034509341166>
 122. Saito A, Horie M, Ejiri K, Aoki A, Katagiri S, Maekawa S, et al. MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis-a pilot study. *FEBS Open Bio.* 2017;7(7):981-94.
 123. Zendjabil M, Favard S, Tse C, Abbou O, Hainque B. Les microRNA comme biomarqueurs : quelles perspectives ? *C R Biol.* 1 févr 2017;340(2):114-31.
 124. Gao B, Zheng L. microRNA Expression in Rat Apical Periodontitis Bone Lesion. *Bone Res.* 28 juin 2013;1(2):170-85.
 125. Yuan X, Berg N, Woong Lee J, Le T-T, Neudecker V, Jing N, et al. MicroRNA miR-223 as Regulator of Innate Immunity. *J Leukoc Biol.* sept 2018;104(3):515-24.
 126. Hanna J, Hossain GS, Kocerha J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front Genet* [Internet]. 16 mai 2019 [cité 2 déc 2020];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6532434/>

127. Kamińska K, Nalejska E, Kubiak M, Wojtysiak J, Żoła Ł, Kowalewski J, et al. Prognostic and Predictive Epigenetic Biomarkers in Oncology. *Mol Diagn Ther*. 2019;23(1):83-95.
128. Bonneau E, Neveu B, Kostantin E, Tsongalis GJ, De Guire V. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC*. 24 juin 2019;30(2):114-27.
129. Abd-Aziz N, Kamaruzman NI, Poh CL. Development of MicroRNAs as Potential Therapeutics against Cancer. *J Oncol* [Internet]. 15 juill 2020 [cité 2 déc 2020];2020. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378626/>

JAFARI (Amine) – Rôle des micro-ARN dans l'homéostasie parodontale et applications cliniques : une revue de la littérature
(Thèse : 3^{ème} cycle Sci. odontol. : Strasbourg : 2021 ; N°11)

N°43.22.21.11

Résumé :

Les maladies parodontales résultent d'un déséquilibre entre la réponse immunitaire et inflammatoire vis-à-vis des bactéries de la plaque. Actuellement, le diagnostic et le pronostic de la maladie parodontale sont basés essentiellement sur les signes cliniques, radiographiques et bactériologiques. Cependant ces éléments de diagnostic et de pronostic n'apparaissent pas suffisants pour évaluer précisément l'évolution de la maladie et en particulier la réponse aux traitements. Les tests biologiques évaluent les variations des biomarqueurs de la réponse de l'hôte. Différents tests sont utilisés depuis plus de dix ans afin de compléter le diagnostic, ils s'appuient sur le dosage de métallo-protéases, de cytokines comme l'IL-1, ou le ratio RANKL/OPG, avec des résultats plus ou moins satisfaisants. Ces biomarqueurs montrent néanmoins leurs limites pour déterminer le déclenchement, l'activité, la prévision de l'évolution et de la progression de la maladie parodontale.

Récemment, des nouveaux marqueurs de la réponse de l'hôte ont été mis en évidence : les micro-ARN. Ce sont des molécules d'ARN non codant constituées d'une vingtaine de nucléotides et intervenant dans la régulation de l'expression génique post-transcriptionnelle. Ils prennent part à la régulation de diverses fonctions physiologiques. Ils interviennent notamment dans la régulation de la réponse immunitaire et inflammatoire ainsi que dans la régulation de la cicatrisation. Au niveau parodontal, les micro-ARN concourent à l'homéostasie tissulaire et se retrouvent dérégulés dans les parodontes pathologiques.

Dans ce travail, nous expliquerons le rôle des micro-ARN dans l'homéostasie des tissus parodontaux. Puis, nous nous proposerons de déterminer dans quelle mesure les micro-ARN pourraient se présenter comme de potentiels marqueurs diagnostiques venant répondre aux limites des biomarqueurs actuels. Enfin, nous discuterons des stratégies et perspectives thérapeutiques qui s'offrent autour de ces molécules.

Rubrique de classement :
parodontologie

Mots clés :

Parodontologie, immunologie, inflammation, biomarqueur, micro-ARN

Me SH : periodontitis, periodontal disease, immunology, inflammation, biomarkers, microRNAs

Jury :

Président : Professeur HUCK Olivier

Assesseeurs : Professeur DAVIDEAU Jean-Luc
Docteur JUNG Sophie
Docteur BOEHLER Christian

Coordonnées de l'auteur :

Adresse postale :

A. JAFARI
1, RUE ANDRE JEANNIN
68440 HABSHEIM

Adresse de messagerie :
aminejafari@gmail.com