

Candidature au Prix CMPS  
« Innovation Santé »

PERIDYSSEQ

*« Analyse de la dysbiose au cours de la  
parodontite par séquençage d'acides  
nucléiques »*

Présenté par Julien Santi-Rocca et Guillaume Depraz  
au nom du consortium PERIDYSSEQ

Décembre 2019

## Table des matières

PERIDYSSEQ – Résumé exécutif .....	1
<i>Curriculum vitae</i> et rôle des membres du projet .....	2
Les coordinateurs.....	2
Une équipe de cliniciens .....	3
Une équipe scientifique .....	8
Le projet PERIDYSSEQ.....	10
La partie scientifique.....	10
État de l'art.....	10
Etiologie .....	10
La physiopathologie de la parodontite : une maladie liée à l'inflammation.....	11
Objectifs du programme de recherche .....	16
Méthodologie et plan de travail .....	17
Plan de financement, financeurs, faisabilité et déroulement .....	22
Financement O1 et O2.....	22
Calendrier et jalons .....	22
Avancée du projet .....	23
Description du projet après son financement par le prix.....	26
Futur du projet au niveau scientifique.....	26
Financement de l'Objectif complémentaire sur la matière sombre.....	26
Perspectives et innovations .....	26
Impact attendu des résultats .....	26
Impact technique scientifique-social et/ou économique .....	26
Diffusion.....	27
Conclusion.....	27
Bibliographie .....	28

## PERIDYSSEQ – RESUME EXECUTIF

Contexte : le diagnostic et le suivi thérapeutique actuels de la parodontite

Affectant plus de la moitié de la population adulte à travers le monde, la parodontite est **la maladie infectieuse la plus prévalente** (toutes infections confondues, pas seulement buccales). Elle se manifeste par une dégradation des tissus de soutien de la dentition se soldant par la perte des dents ou des implants dentaires, associées à des souffrances psychologiques (apparence physique dégradée, sentiment de décrépitude, etc.) Actuellement, le **diagnostic** de la maladie se base sur la détection des **dommages** cliniques – **irréversibles et tardifs** – en les mesurant. De plus, l'implication de la flore parodontale dans le développement des **maladies associées** (maladies cardio-vasculaires, diabète, Alzheimer, athérosclérose, polyarthrite rhumatoïde, infertilité, troubles de la grossesse, et certains types de cancers) a été mise en avant et reste à mieux évaluer.

Objectif clinique : des outils microbiologiques pour un diagnostic précoce et préventif

Les dommages cliniques sont précédés de changements au niveau de la flore parodontale, ce qui permet une **détection précoce** de la maladie et même d'en **prévenir** le développement à travers des campagnes de dépistage. De plus, les traitements conventionnels (à fort taux d'échec et de récurrence) sont actuellement évalués sur des critères cliniques, tardifs, qui reflètent l'arrêt de l'inflammation, elle-même précédée de changements au niveau de la flore. Des **outils microbiologiques** permettent d'agir précocement, en temps réel, en adaptant et **personnalisant le traitement**.

Objectif scientifique

Alors que la flore bactérienne est bien définie dans la santé et la parodontite, des **données fiables manquent** lors de la **gingivite** et pour les entités non-bactériennes, notamment les **parasites**.

Le projet PERIDYSSEQ a pour but de **définir le microbiome parodontal** dans la santé, la gingivite et la parodontite, ainsi que les associations au sein de celui-ci. Prenant en considération la totalité des espèces microbiennes (connues/inconnues, eucaryotes/procaryotes), ce programme scientifique vise à **redéfinir l'écologie et la physiopathologie des maladies parodontales**.

Ce programme génère des données scientifiques à fort potentiel d'**application**. Les perspectives en **santé publique** sont déjà prometteuses et nous nous attendons à ce qu'elles génèrent des **innovations** en termes de **traitement** et de **prévention**. Les apports fondamentaux de ce projet et les outils développés grâce à eux pourraient totalement **remettre en cause la formation initiale des chirurgiens-dentistes en parodontologie**.

Délivrables

Le projet s'est articulé autour de deux objectifs principaux :

- Objectif 1 : Définir les **profils microbiens** définissant santé et maladie.
- Objectif 2 : Définir les **interactions élémentaires** dans les communautés microbiennes.
- Objectif complémentaire : Définir la **matière sombre** biologique parodontale

Budget

Total prévu : 66 k€, mobilisés sur 18 mois en deux volets.

- Le premier volet a été financé en totalité à hauteur de 56 k€ par l'association AMIB et les chirurgiens-dentistes impliqués dans le projet.
- Le second volet, complémentaire, coûterait 10 k€.

Intérêts du Prix Innovation pour PERIDYSSEQ

- Obtention du **financement** de l'étude complémentaire : l'analyse de la matière sombre biologique (matériel microbien inconnu) de la plaque dentaire.
- **Diffusion des résultats** obtenus auprès des professionnels de santé (dentistes, médecins, sociétés scientifiques), des organismes sociaux, des complémentaires santé et du grand public.

Intérêts pour le Crédit Mutuel Professions de Santé

- Visibilité comme **financeur** dans toutes les communications scientifiques émanant du projet (au moins 2 articles et plusieurs conférences attendues)
- Visibilité du CMPS vis à vis de la communauté médicale **comme pionnier dans la recherche** de pointe en France et en Europe, sur un sujet à **fort potentiel d'impact** au niveau santé et médiatique. Le CMPS peut ultérieurement communiquer sur cette étude pour démontrer son implication forte et spécifique auprès des professionnels de santé.

Equipe de recherche

Composée de cliniciens experts en parodontie et formés à la recherche scientifique, de scientifiques experts en biologie moléculaire, en microbiologie, en immunologie et en statistiques, cette équipe internationale a déjà plusieurs publications scientifiques à son actif.

## Curriculum vitae et rôle des membres du projet

### Les coordinateurs

Dr Julien SANTI-ROCCA

Co-porteur et initiateur du projet, un scientifique impliqué dans toutes les étapes du projet.

Science and Healthcare for Oral Welfare, Toulouse.

Le Dr Julien Santi-Rocca a orienté sa carrière dans la recherche fondamentale et translationnelle sur les maladies humaines. Après avoir étudié le VIH (INSERM, Marseille, 2001), le séquençage d'acides nucléiques (ECORC, Ottawa, Canada, 2001) et *Neisseria gonorrhoeae* (Université d'Ottawa, 2002), il a orienté sa carrière vers l'étude des relations hôte-parasite dans le cadre des maladies parasitaires : amibiase (Institut Pasteur, DEA et thèse doctorale, 2003-2008, Premier Prix de la Société Française de Parasitologie), maladie de Chagas (CBMSO, 2009-2012), trypanosomiase africaine (Institut Pasteur, 2012-2014) et toxoplasmose (INSERM, Toulouse, 2015-2017). Il a depuis créé et dirige "Science and Healthcare for Oral Welfare", une société ayant pour mission d'améliorer la santé orale en apportant des solutions scientifiques et techniques pour la prise en charge des maladies parodontales. Il y dirige des projets scientifiques fondamentaux et leur traduction vers l'innovation.

Le Dr Santi-Rocca est auteur de 21 articles cités 414 fois, avec un facteur h de 12 (<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=23089369000>). Il détient aussi une demande d'invention portant sur l'application de sa recherche au diagnostic de l'amibiase.

Dr Guillaume DEPRAZ

Co-porteur du projet et clinicien impliqué dans la conception et l'écriture du projet. A aussi participé, au même titre que les autres cliniciens, à la collecte des échantillons.

### Adresse professionnelle

3 Avenue Galliéni  
49130 Les Ponts de Cé

### Formation

Doctorat de chirurgie-dentaire en 1998 (faculté d'Odontologie de Nantes)

Attestation de parodontie clinique en 2004 (PARO CONCEPT Jacques Charon)

Attestation d'anatomie clinique oro-faciale en 2006 (SAPO : Société d'Anatomie et de Pathologie Oro-faciale)

Certificat de chirurgie implantaire en 2007 (SAPO)

Attestation de chirurgie avancée en 2010 (Génération Implant) chirurgie-muco-gingivale, greffes osseuses et sinus lift.

Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale en 2017 (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

Certificat de compétence clinique LASER en 2019 avec la SOP (Société Odontologique de Paris).

### Une équipe de cliniciens

Les docteur·e·s en chirurgie et médecine dentaire ont participé au projet au cours de son élaboration et pour la collecte des échantillons et des informations cliniques auprès des patient·e·s.

---

Dre Véronique AMARD

Adresse professionnelle

13 Avenue de la République  
94100 St Maur des fossés

Formation

Doctorat en Chirurgie-dentaire (faculté d'odontologie de Paris).  
Licence de biologie des organismes et des populations Montpellier  
DU de réhabilitation maxillofaciale Paris 7  
Certificat de compétence clinique « Acquérir et maîtriser les technologies Laser assistées »  
Paris 5  
Post-graduate de Paro-implantologie, New York University  
Attestation de parodontie clinique (PARO CONCEPT Jacques Charon)  
Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

---

Dr Pierre AMIOT

Adresse professionnelle

2 Rue Avicenne - Médipole 2  
66330 Cabestany

Formation

Doctorat de chirurgie-dentaire (faculté d'odontologie de Montpellier).  
Post-graduate Perio-implantology, New York University  
Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

---

Dre Charlotte BAR

Adresse professionnelle

1 Place Aristide Briand  
02400 Château-Thierry

Formation

Doctorat de chirurgie-dentaire en 1996 (Faculté d'odontologie de Reims).  
Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

---

Dre Nefissa BERKANI

Adresse professionnelle

20 Rue de la Rochefoucauld  
75009 Paris

Formation

Doctorat en chirurgie dentaire.  
D.U. de parodontologie de la faculté Paris VI  
D.U. d'Implantologie de la faculté Paris VI  
Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

---

Dr Mark BONNER

Adresse professionnelle

455, Promenade des Anglais  
06200 Nice

Formation

Membre de l'Institut Canadien d'Implantologie Orale  
Certificat en biologie médicale UQTR (2002)  
Certificat en chirurgie implantaire de Mich Institute of oral Implantology de Pittsburg, 1995  
Certificat en chirurgie et prosthodontie implantaire, clinique Bräenemark, Marseille, 1994  
Certificat en chirurgie implantaire et réhabilitation prothétique de l'hôpital Cochin, Paris, 1994  
Membre fondateur de l'Association de Médecine Dentaire Holistique du Québec  
Membre de l'Académie Informatisée du Canada (regroupant les principaux dentistes utilisateurs de l'appareil CEREC II)  
Diplômé en occlusion de l'institut Pankey, Miami, 1993  
Doctorat en médecine dentaire, Université de Montréal, 1977

Publications

Tant de bouches à guérir... des parasites qui les vampirisent. Vaincre la parodontite. Editions Amyris. 303 pages, 2009. ISBN : 978-2-9303-5375-3  
Bonner M, Fresno M, Gironès N, Guillén N, Santi-Rocca J. Reassessing the Role of *Entamoeba gingivalis* in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Oct 29;8:379. doi: 10.3389/fcimb.2018.00379  
Marty M, Bourrat E, Vaysse F, Bonner M, Bailleul-Forestier I. Direct Microscopy: A Useful Tool to Diagnose Oral Candidiasis in Children and Adolescents. *Mycopathologia.* 2015 Dec;180(5-6):373-7. doi: 10.1007/s11046-015-9933-y.  
Marty M, Bonner M, Vaysse F. Observation of trichomonads infection in a child with periodontitis by direct microscopy at the dental office. *Parasitology.* 2015 Sep;142(11):1440-2. doi: 10.1017/S0031182015000876.

Bonner M, Amard V, Bar-Pinatel C, Charpentier F, Chatard JM, Desmuyck Y, Ihler S, Rochet JP, Roux de La Tribouille V, Saladin L, Verdy M, Gironès N, Fresno M, Santi-Rocca J. Detection of the amoeba *Entamoeba gingivalis* in periodontal pockets. Parasite. 2014;21:30. doi: 10.1051/parasite/2014029.

Mascrès C., Bonner M. Corrélations entre les signes cliniques, cytologiques et histologiques des pulpites chez l'homme. J Canad Dent Assn, no 2, 1978.

Mascrès C., Bonner M. Action de l'acide acétyl-salicylique administré par différentes voies sur les tissus sanguin et buccaux du rat. Rev. Can. Biol., vol. 35, no 4, décembre 1976, p. 193-197.

---

Dre Ivonne CARTAGENA

Adresse professionnelle

95 Avenue de l'Isle de Riez  
85270 St Hilaire de Riez

Formation

Doctorat en chirurgie dentaire

---

Dr Jean-Michel CHATARD

Adresse professionnelle

4, bis Rue d'Isly  
87000 Limoges

Formation

Diplôme d'État de docteur en chirurgie dentaire

---

Dre Isabel MORALES

Adresse professionnelle

37 Bd Alsace Lorraine  
64000 Pau

Formation

Doctorat en chirurgie dentaire en 1986 (faculté d'odontologie de Toulouse).

CES Biomatériaux 1988

CES Parodontologie 1989

Formations en Implantologies SAPO et AIXPO parodontologie GEPI,

Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale en 2016 (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

---

Dre Narcisa POPA

Adresse professionnelle

59 Rue Galilée ; 75008 Paris

#### Formation

Doctorat en chirurgie dentaire

1993 : C.E.S. Biologie de la bouche - Faculté de médecine de Paris 7

1994 : C.E.S. Chirurgie dentaire - Parodontologie - Faculté de médecine de Paris 7

1991 – 2006 : Attachée du service de Stomatologie Hôpital Cochin

CES d'anatomo-physiologie de la bouche

CES de Parodontologie

Diplôme Universitaire de Parodontologie et d'Implantologie (Paris VII)

Diplôme Universitaire de Chirurgie et Prothèses Implantologiques (Université René Descartes – Faculté de Médecine de Paris 15)

Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

Post-graduate in Clinical Implantology and Periodontics, New-York University – USA

---

Dr Stéphane REGNIERS

Adresse professionnelle

14 Rue du Maine

75014 Paris

#### Formation

Doctorat en chirurgie dentaire (faculté d'odontologie de Paris VII).

Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

---

Dre Catherine ROBERT

Adresse professionnelle

255 Bd Voltaire

75011 Paris

#### Formation

Doctorat de chirurgie-dentaire en 1989 (Faculté de chirurgie dentaire de Paris Diderot)

Master 2 d'expertise appliquée à l'odonto-stomatologie

Formation Parodontie Médicale Paroconcept Dr Charron. Lille

Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

---

Dr Arnaud TREMOUREUX

Adresse professionnelle

42 Bd de l'Université

44600 St Nazaire



Formation

Doctorat en chirurgie dentaire

Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

---

Dre Marion VERDY

Adresse professionnelle

14 Rue du Maine

75014 Paris

Formation

Doctorat de chirurgie dentaire (Faculté dentaire de Paris V)

D.U. de réhabilitation chirurgicale maxillo-faciale Paris VII

Post Graduate of Periodontology and Oral rehabilitation New-York University

CES de parodontologie Paris V

Certificat d'approche microbiologique en santé parodontale (Institut International de Parodontie Mark Bonner)

---

## Une équipe scientifique

Le rôle de l'équipe scientifique a débuté lors de la rédaction concertée du projet, qui a émergé de l'identification de besoins en connaissances à partir de l'analyse de la littérature scientifique et de l'écoute des attentes des cliniciens pour améliorer leur pratique. Après cette phase préparatoire, au cours de laquelle les scientifiques ont formé les cliniciens à la recherche, ils se sont concentrés sur le traitement des échantillons obtenus et l'analyse des résultats sur plusieurs niveaux : tout d'abord, la transformation de l'échantillon clinique par purification d'acides nucléiques, puis le séquençage et enfin les différentes analyses, exhaustivement décrites en ce document.

---

Dr Francisco CALLEJAS HERNÁNDEZ

Centre de Biologie Moléculaire Severo Ochoa, Université Autonome de Madrid.

Le Dr. Callejas-Hernández a soutenu en novembre 2019 sa thèse doctorale à l'UAM. Il est spécialisé en biologie moléculaire et en bioinformatique. Il effectue les analyses bio-informatiques pour PERIDYSSEQ. Il est auteur de 5 articles, cités 12 fois et a un facteur h de 2 (<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57200420877>)

---

Pr Manuel FRESNO ESCUDERO

Centre de Biologie Moléculaire Severo Ochoa, Université Autonome de Madrid.

Professeur à l'Université autonome de Madrid (depuis juin 2000). Ancien Directeur du Département de Biologie Moléculaire (2002-2005), puis du Centre de Biologie Moléculaire Severo Ochoa rattaché au CSIC (2008-2012). Actuellement coordinateur de projets scientifiques pour la Communauté de Madrid, pour la Commission Européenne (HOMIN), et Directeur Scientifique de la spin-off DIOMUNE, S.L. Il participe à l'analyse des résultats de séquençage et apporte son expérience en maladies infectieuses et sa vision intégrative pour les problématiques de santé publique.

Auteur de 262 articles de revues ou chapitres d'ouvrages scientifiques, cités 8588 fois, avec un indice H de 50. Il a publié dans des revues aussi notoires que : Nature (1), Nature Immunol (1) Cell (2) J. Exp. Med. (5), EMBO J. (1), J. Biol. Chem (16), J. Immunol. (14), J. Virol. (4), European J. Immunol. (13), Blood (2), Cancer Res (2), Cardiovascular Res (1), Oncogene (1), AIDS (2), J. Clin. Invest. (1), Trends Parasitol. (1), Trends Molecular Medicine (1), Immunology Today (1), Progress in Neurobiology (1), J. Neurochem. (3), PLoS Path (1). Il détient plusieurs brevets dans le domaine du diagnostic et de l'immunologie.

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7103355437>

---

Dre Núria GIRONÈS PUJOL

Centre de Biologie Moléculaire Severo Ochoa, Université Autonome de Madrid.

La Dre Núria Gironès Pujol a soutenu sa thèse en 1991 à l'Université Autonome de Madrid portant sur un travail doctoral effectué au « Howard Hughes Medical Institute », Worcester, Massachusetts (U.S.A). Elle a obtenu un Prix pour sa thèse en 1993 et a alors intégré le laboratoire du Dr Manuel Fresno au Centre de Biologie Moléculaire Severo Ochoa, Université Autonome de Madrid (UAM). Elle est, depuis 2019, professeure titulaire en Biologie Moléculaire à l'UAM et étudie les interactions immunes et la biologie moléculaire des infections. Elle participe à l'analyse des données, avec une attention particulière sur la microbiologie, qu'elle enseigne au plus haut niveau à l'UAM.

La Dre Gironès Pujol est auteure de 52 articles cités 1423 fois, avec un facteur h de 23 (<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6602509140>). Elle détient aussi un brevet portant sur des applications de sa recherche au diagnostic de la maladie de Chagas.

---

Dre Nancy GUILLEN

Institut Pasteur, Paris

La Dre Nancy Guillén a occupé un poste de professeure à l'Université Centrale du Venezuela depuis 1972. Elle a par la suite soutenu sa thèse doctorale à l'Université de Paris Orsay (1993), où elle a enseigné, avant d'être recrutée comme directrice de recherche au CNRS (1983) et d'effectuer un stage post-doctoral (Public Health Research Institute of the City of New York, 1986-87). Elle dirige une unité de recherche à l'Institut Pasteur de Paris depuis 2003, étudiant la génétique, la biologie moléculaire et la biologie cellulaire de l'amibe *Entamoeba histolytica*, ainsi que la physiopathologie des infections par ce parasite *in vivo* et dans des modèles *in vitro*. Elle participe aux analyses et apporte son expérience dans les projets génétiques avec classification « *de novo* ».

La Dre Nancy Guillén est auteure de 143 articles cités 2955 fois, avec un facteur h de 37 (<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7003886496>). Elle détient aussi une demande d'invention portant sur l'application de sa recherche au diagnostic de l'amibiase.

---

Dr David MARTIN

Science and Healthcare for Oral Welfare, Toulouse.

Docteur en Sociologie, Professeur agrégé en sciences économiques et sociales, ancien élève de l'Ecole Normale Supérieure de Paris-Saclay. Diplômé du Programme Exécutif en Business Analytics d'ICADE (Université P. de Comillas, Madrid). Co-fondateur de Science and Healthcare for Oral Welfare (SHOW).

Au-delà de ses recherches en socio-économie, il contribue comme spécialiste en méthodes quantitatives à des publications en microbiologie. Il est responsable des analyses et modélisations statistiques avancées que nécessitent le projet.

## Le projet PERIDYSSEQ

### La partie scientifique

#### Titre

PERIODontitis DYSbiosis analysis by nucleic acid SEQuencing – PERIDYSSEQ

« Analyse de la dysbiose au cours de la parodontite par séquençage d'acides nucléiques »

#### État de l'art

##### La parodontite : un impact sous-estimé

La parodontite est une maladie conduisant à la **destruction** de l'os alvéolaire et finalement à la perte des dents et/ou des implants dentaires. Au-delà de la douleur causée par les blessures, de l'édentulisme éventuel et des défauts d'occlusion, les patients souffrent d'halitose (Silva *et al.*, 2017) et de problèmes esthétiques (Nieri *et al.*, 2013). Au total, ces effets directs et en partie irréversibles de la maladie peuvent expliquer une détresse psychologique et sociale (Lopez *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2015; Dumitrescu, 2016; Reynolds and Duane, 2018)

La **prévalence** de la parodontite est constante au sein des régions de référence de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : une personne sur deux est atteinte entre 35 et 44 ans (Petersen and Ogawa, 2005). Cette prévalence augmente avec l'âge (Demmer and Papapanou, 2010). Aux USA, entre 2009 et 2012, 46% des adultes de plus de 30 ans étaient atteints de parodontite (Eke *et al.*, 2015).

La parodontite est une **maladie handicapante**, pour laquelle l'OMS a calculé la perte de 3 518 002 DALYs (années de vie ajustées en fonction du handicap, une mesure de la morbidité exprimée comme la perte d'années de vie en bonne santé) en 2015 dans le monde, ce qui signifie 0,132% des DALYs (Organization, 2016). Cependant, le poids de l'incapacité associée est sous-estimé (0,007), reflétant seulement "saignements mineurs des gencives de temps en temps, avec un léger inconfort" (Evaluation, 2016). Or, **la parodontite est liée à de nombreux troubles systémiques** comme le diabète (Nascimento *et al.*, 2018), les maladies cardiovasculaires (Leira *et al.*, 2017), la maladie d'Alzheimer (Dominy *et al.*, 2019), la polyarthrite rhumatoïde (Tang *et al.*, 2017), les troubles de la gestation (Manrique-Corredor *et al.*, 2019) et l'obésité (Chaffee and Weston, 2010). Mais, le lien étiologique étant parfois difficile à démontrer et à mesurer, l'impact indirect de la parodontite en termes de DALYs à travers ces autres affections est ignoré dans les calculs.

Cependant, la parodontite reste majoritairement indolore et est responsable de la plupart des pertes de dents devant la carie. Enfin, pour diverses raisons, **la vaste majorité des patients ne se soignent pas** : acceptation de la maladie comme une fatalité physiologique liée à l'âge, problèmes économiques, croyance que la maladie ne se soigne pas...

#### Etiologie

**L'étiologie** de la parodontite elle-même **n'est pas encore claire** et reste classée par l'OMS comme une « maladie non transmissible », malgré son caractère manifestement infectieux. Un lien entre certains facteurs génétiques et la parodontite existe chez l'homme (Vieira and Albandar, 2014), soulignant une prédisposition chez certains individus pour des types donnés

de parodontite (Offenbacher *et al.*, 2016). Des facteurs de risque modifiables pour la maladie ont également été recherchés et certains paramètres ont été identifiés : le tabagisme (Eke *et al.*, 2016), la consommation d'alcool (Wang *et al.*, 2016), et une mauvaise hygiène buccodentaire (Lertpimonchai *et al.*, 2017).

L'évolution vers la parodontite passe par trois étapes : la formation de plaque dentaire, (ii) la gingivite, ou inflammation des gencives, et (iii) la parodontite, dans laquelle l'os alvéolaire et les fibres qui maintiennent les dents sont irrémédiablement endommagés.

La physiopathologie de la parodontite : une maladie liée à l'inflammation

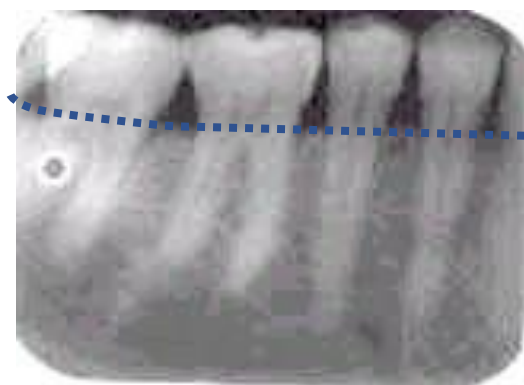
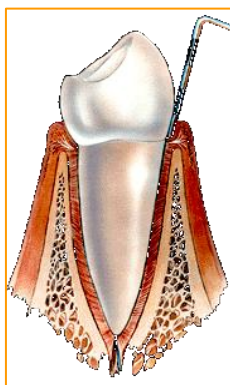
La physiopathologie de la maladie fait toujours l'objet d'un vif débat, mais un consensus a été atteint sur certains points clés. Tout d'abord, **l'inflammation est obligatoire et précède la perte osseuse**, comme en témoigne la formation de poches (revu dans (Van Dyke, 2017)). Ensuite, la flore microbienne de la poche parodontale diffère de celle observée dans les sillons sains (Marsh, 1994). Enfin, la plaque et le calcul (le tartre) aggravent le pronostic (Löe *et al.*, 1965).

Le traitement conventionnel dans les cliniques est basé sur l'ablation mécanique et/ou chirurgicale de la plaque dentaire, du calcul voire des tissus endommagés/enflammés (Smiley *et al.*, 2015). Ces solutions inefficaces traitent des symptômes tardifs sans considérer les causes évoquées de la maladie. **La clé pour l'amélioration de la gestion de la parodontite dans le monde entier est donc une meilleure connaissance de sa physiopathologie, conduisant à un diagnostic précoce et efficace menant à une prise en charge appropriée et éventuellement préventive.**

Le diagnostic clinique : un outil tardif

La santé

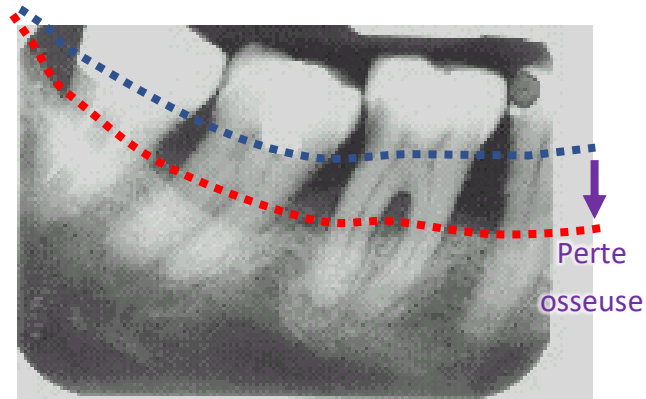
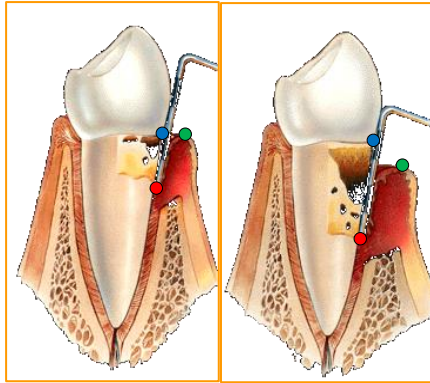
Une gencive en bonne santé présente une couleur rose pâle, ne saigne pas. Le bord des gencives autour des dents (le sulcus) est adhérent.



La profondeur du sillon (schéma de gauche, face droite de la dent) est inférieure à 3 mm, mesuré par une graduation sur la sonde parodontale entre le fond de la poche et la marge de la gencive libre. En l'absence d'atteinte antérieure, l'os alvéolaire, qui soutient les dents, atteint le niveau de la jonction entre la couronne et la racine (jonction amélo-cémentaire), comme apprécié sur la radiographie (à droite) par la ligne bleue en pointillé.

## La parodontite

Petit à petit, et parfois sans signe visible ni douleur, **l'os soutenant les dents est détruit** créant ainsi une poche dans laquelle du tartre s'accumule, entretenant l'inflammation et empêchant la gencive de se recoller à la racine.



La poche est détectable lors du sondage parodontal, et son activité est appréciée en fonction de sa profondeur (schémas à gauche), mesurée entre le fond de la poche (points rouges) et la marge gingivale (points verts). Une atteinte récente (schéma de gauche) donnera un faible recul de la marge gingivale (points verts) par rapport à la jonction amélo-cémentaire (points bleus), contrairement à une atteinte chronique (schéma de droite). La perte osseuse s'évalue par la distance entre la jonction amélo-cémentaire (points bleus) et le fond de la poche (points rouges), celle-ci reflétant le niveau de l'os alvéolaire.

La **perte osseuse** peut aussi se mesurer par radiographie (à droite), en comparant le niveau réel de la crête osseuse (ligne rouge) à son niveau d'origine (ligne bleue). La radiographie ne permet cependant pas de juger de l'activité lytique en cours.

En fonction du développement de la maladie, on trouvera les signes suivants, plus ou moins prononcés :

- Un saignement des gencives au brossage ou spontanément.
- Une gencive gonflée, irritée, sensible voire douloureuse
- Une mauvaise haleine persistante ou un mauvais goût (métallique)
- Une rétraction de la gencive : le déchaussement des dents
- Des dents qui bougent ou qui changent de place.

L'os diminuant progressivement, le déchaussement s'accroît, les dents deviennent de plus en plus mobiles allant jusqu'à tomber. Il est important de noter que le **diagnostic clinique**, qui a un véritable intérêt pour évaluer les dommages, est **tardif** car il se base sur l'apparition de ces **dommages**, pour la plupart **irréversibles**. Un **diagnostic microbiologique**, qu'il soit **microscopique** ou génétique, offre la possibilité d'**anticiper voire de prévenir** les dommages cliniques avant leur apparition. Outre l'intérêt évident pour le patient, une stratégie intégrée de prévention permettrait de **diminuer les dépenses liées au traitement**, alors moins fréquent et moins difficile, à la reconstruction (greffes et implants) et à la prise en charge des maladies associées (par exemple, diabète).

## Microbiologie de la parodontite : le paradigme bactérien

Bien que la salive contienne des systèmes de défense antimicrobiens (revu dans (van 't Hof *et al.*, 2014)) et de faibles concentrations d'éléments nutritifs, la cavité buccale saine abrite un microbiote commensal, composé notamment de communautés bactériennes (environ 1 000 espèces chez les humains, (Consortium, 2012)). La contribution des virus, parasites, archées et champignons à cet équilibre reste à caractériser. Les micro-organismes et les muqueuses buccales entretiennent une **relation symbiotique mutualiste et résiliente** (Rosier *et al.*, 2018). L'écosystème bactérien des sillons sains est curieusement similaire entre les individus, comprenant des bacilles et des cocci immobiles, comme on le voit en microscopie (Listgarten, 1976), avec des espèces bactériennes différentes de celles rencontrées sur la langue (Aas *et al.*, 2005; Consortium, 2012; Rogers and Bruce, 2012). À la surface des dents, en particulier dans le sillon dentaire, les nutriments provenant des aliments et des débris cellulaires s'accumulent et soutiennent la survie des bactéries qui adhèrent et colonisent l'émail dentaire. Flagelles bactériens, pili, et protéines de surface peuvent recruter d'autres bactéries, par co-agrégation (Kolenbrander and Celesk, 1983; Gibbons *et al.*, 1988). En outre, la sécrétion de polysaccharides initie la formation et l'organisation d'un échafaudage moléculaire (Jakubovics, 2010), tandis que les molécules de signalisation intercellulaire régulent le développement des biofilms, notamment par un mécanisme de *quorum sensing* médié par différents types de messagers, comme la di-guanosine monophosphate cyclique ou LuxS (revu dans (Marsh *et al.*, 2011)). Cette communication intra- et inter-espèces conduit à la coordination de leurs activités et augmente les chances de transfert de matériel génétique. **La plaque dentaire qui en résulte est donc un biofilm organisé, dont la formation n'est pas pathologique** (Gibbons and van Houte, 1973), bien qu'on ait pensé qu'il était responsable de la gingivite et de la parodontite (Schultz-Haudt *et al.*, 1954).

Certaines bactéries sont associées à la parodontite, **ce qui a conduit à penser qu'un type spécifique de plaque était responsable de la maladie** (Loesche, 1979). Ces bactéries se regroupent en « clusters » associées à la progression de la maladie (Socransky *et al.*, 1998), reflétant la colonisation séquentielle géographique et temporelle du sillon et de la poche parodontaux (Li *et al.*, 2004; Feres *et al.*, 2016). Le complexe rouge "parodontopathogène" est composé de bactéries anaérobies (*Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, et *Porphyromonas gingivalis*), soutenant l'hypothèse d'une modification progressive de l'environnement antérieure et nécessaire à la colonisation par d'autres types de bactéries (Marsh, 2003; Darveau, 2010). **Cependant, *P. gingivalis* est présent chez certains patients en bonne santé** (Socransky *et al.*, 1998) et était supposé peu abondant, même en parodontite (Moore *et al.*, 1982), alors que ce « pathogène clé de voûte » provoque des changements environnementaux dans le sulcus favorisant l'inflammation (Hajishengallis *et al.*, 2011). Ainsi, des réserves quant au rôle exclusif de *P. gingivalis* dans l'étiologie de la parodontite ont été émises, du moins en regard des postulats de Koch.

Les postulats de Koch sont le cas extrême des critères de causalité de Hill (Hill, 1965), dans lequel l'infection par un seul agent étiologique est le paramètre unique influençant l'apparition de la maladie (Inglis, 2007). Ainsi, la recherche d'un seul agent pathogène expliquant l'étiologie de la parodontite par elle-même, suivant les postulats de Koch, risque



d'être vaine. En revanche, la parodontite, en tant que maladie de biofilm (Schaudinn *et al.*, 2009), peut résulter de l'intégration de divers paramètres causatifs. Les bactéries font partie de ces paramètres et la composition des communautés microbiennes est en corrélation avec les tableaux cliniques (Feres *et al.*, 2016; Hunter *et al.*, 2016). En effet, certaines espèces peuvent être utilisées efficacement comme marqueurs pour le diagnostic (Meuric *et al.*, 2017), et leur utilisation de façon multivariée est d'un intérêt particulier pour l'épidémiologie ou le suivi du traitement.

Outre les changements dans sa composition, la communauté bactérienne peut abriter des changements dans ses fonctions, générant un nouvel équilibre (**dysbiose**) qui est possible dans le nouvel environnement de plaque dentaire (Hajishengallis and Lamont, 2012). Les entités bactériennes collaborent et les changements fonctionnels tels que le synergisme sont mis en évidence au niveau transcriptionnel (Kirst *et al.*, 2015; Yost *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2018). Néanmoins, l'abondance de certaines espèces de bactéries n'est pas synonyme de leur activité (Mark Welch *et al.*, 2016), un fait compatible avec la théorie du « pathogène clé de voute » et avec le rôle de *P. gingivalis* dans la formation de l'écologie de la poche parodontale. Cette écologie est impactée par les communautés dysbiotiques, comme en témoignent *in vitro* les réponses inflammatoires de l'hôte dérégulées (Yost *et al.*, 2017; Herrero *et al.*, 2018). Les conséquences de la dysbiose ont également été démontrées *in vivo* au niveau **systémique**, avec des **changements métaboliques** liés au diabète (Branchereau *et al.*, 2016; Blasco-Baque *et al.*, 2017).

#### D'autres agents pathogènes dans la parodontite ?

La diversité génétique naturelle de l'hôte humain a permis d'identifier diverses composantes des infections parodontales : certains traits pathologiques sont préférentiellement associés à des mutations génétiques (Offenbacher *et al.*, 2016) et **le paradigme de la parodontite à *P. gingivalis* n'est peut-être qu'une des possibilités ou l'une des étapes de la pathophysiologie d'un ensemble de pathologies regroupées sous le même nom.** En effet, la cinétique de l'évolution de la parodontite a été rarement étudiée et d'autres agents possibles peuvent être considérés.

Tout d'abord, le parasite ***Entamoeba gingivalis*** - nommé "*Amoeba gengivalis*" au moment de sa découverte - a été identifié dès 1849 dans des échantillons de plaque dentaire, grâce à la reconnaissance d'un mouvement amibien caractéristique et à la présence de vésicules internes (Gros, 1849). Bien que des amibes libres aient été décrites depuis 1755 (Rösel von Rosenhof, 1755), *E. gingivalis* est la première amibe qui a été trouvée chez l'homme. La pathogénicité d'*Entamoeba gingivalis* a été interrogée assez vite après sa découverte, d'autant que le contexte intellectuel de l'époque favorisait la recherche de l'établissement de liens étiologiques entre microorganismes et maladies, le sillage de Pasteur et Koch (Kartulis, 1893). Aussi, la première étude systématique associant cette amibe à la parodontite a été publiée de façon préliminaire en 1914 (Barrett, 1914): des amibes avaient été détectées dans l'ensemble des 46 cas de pyorrhée (parodontite) qui avaient été inclus dans l'étude.

Nous avons montré une prévalence de *E. gingivalis* de 80,6% (58/72) dans les sites en parodontite et 33,3% (11/33) dans les sites sains par PCR conventionnelle, avec des contrôles



de l'inhibition de PCR et de la dégradation de matrice (Bonner *et al.*, 2014). Récemment, la transcriptomique a révélé que des séquences d'ARNr 18s d'*E. gingivalis* ont été détectées dans toutes les poches parodontales (4/4) et étaient moins abondantes dans 60 % (6/10), ou non détectées dans 40 % (4/10) de sites sains (Deng *et al.*, 2017). De plus, des variants génétiques d'*E. gingivalis* ont été identifiées (Cembranelli *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2018) et différents niveaux de virulence reflétés au niveau transcriptomique chez des parasites génétiquement identiques peuvent expliquer des écarts dans leur détection moléculaire par rapport aux diagnostics clinique ou microscopique (Santi-Rocca *et al.*, 2008). La nouvelle caractérisation clinique de la parodontite permettra d'homogénéiser la définition de la santé et des divers grades de la maladie, et ainsi de diminuer la variabilité des résultats entre les études (Bonner *et al.*, 2014; Tonetti *et al.*, 2018).

Pour résumer, ces données suggèrent qu'*E. gingivalis* peut être asymptomatiquement présente dans certains sillons et peut être associé à la maladie après des changements environnementaux, rappelant l'agent pathogène intestinal du même genre : *Entamoeba histolytica*.

Outre cette entité non-bactérienne bien étudiée liée à la parodontite, d'autres peuvent être impliquées. Certains transcrits venant d'espèces de virus et d'archées ont une abondance différente entre les personnes saines et malades (Deng *et al.*, 2017). En particulier, les virus herpès sont associés à la parodontite (Slots, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). Par ailleurs, un autre protozoaire est présent dans certains cas de parodontite humaine : ***Trichomonas tenax*** (Marty *et al.*, 2017; Bisson *et al.*, 2018) et des variants génétiques sont associés à divers grades de la maladie (Benabdelkader *et al.*, 2019). Enfin, un grand nombre de séquences génétiques détectées en santé et lors de la maladie ne sont pas attribuées à des organismes et se trouvent, de fait, exclues de la plupart des études. Ces séquences non-identifiées peuvent atteindre jusqu'à 50% du matériel séquencé (Deng *et al.*, 2017), ce qui signifie que, virtuellement, la moitié de l'information générée par ces méthodes est ignorée.

## Objectifs du programme de recherche

La parodontite évoluant à partir d'une inflammation initiale, la gingivite, nous émettons l'hypothèse qu'un **changement dans les populations microbiennes** est corrélé au passage de la santé à la gingivite, puis de la gingivite à la parodontite.

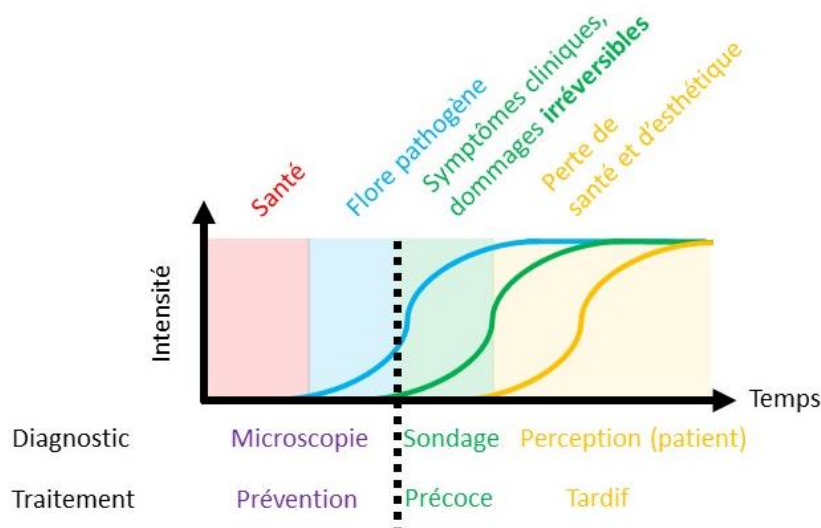
Notre approche est basée sur la définition des microbiotes de santé, de gingivite et de parodontite par des **méthodes génétiques non-biaisées**, c'est-à-dire permettant l'identification de tous les organismes présents dans la flore et dans les banques de référence, et d'en déterminer l'abondance. Les organismes présents dans la flore mais absents des banques de données seront classés taxonomiquement par des méthodes bio-informatiques et leurs séquences seront incluses dans les analyses.

**Objectif 1 : Définir les profils microbiens définissant santé et maladie**

**Objectif 2 : Définir les interactions élémentaires dans les communautés microbiennes**

**Objectif complémentaire : Analyser la matière sombre biologique.**

Ainsi, nous espérons que notre stratégie sans *a priori* permette de redéfinir l'évolution des communautés microbiennes au cours du développement des maladies parodontales, et ainsi de fournir les **outils nécessaires pour un diagnostic précoce du risque parodontal** dans une stratégie intégrant la prévention. Les retombées pour les praticiens peuvent être immédiates, à travers des recommandations et l'utilisation au cabinet du microscope ou de tests génétiques appropriés.



Alors que les **consultations** motivées par la perte de santé ou d'esthétique ressentie par le patient sont **tardives** dans le cours de la maladie, les **bilans préventifs** chez les dentistes permettent de traiter plus précocément les **dommages**, qui restent cependant **irréversibles**. La mise en pratique de **dépistages microbiologiques préventifs**, notamment microscopiques, permettrait de traiter les patients avant que les dommages n'apparaissent, et ainsi la **conservation de l'intégralité de leur capital santé parodontal**.

## Méthodologie et plan de travail

### Objectif 1 : Définir les profils microbiens définissant santé et maladie

Les cliniciens participant au projet ont recueilli la plaque dentaire subgingivale de patients lors de leur visite pour un bilan parodontal. En fonction de leur état de santé parodontal, déterminé sur des critères cliniques (sondage et inflammation), les échantillons ont été classés en trois catégories : santé, gingivite et parodontite. Dans le but d'identifier les microbes présents dans ces échantillons, ils ont été conservés dans un milieu que nous avons développé (Bonner *et al.*, 2014) puis traités comme décrit ci-dessous.

### Tâche 1 : Collecte d'échantillons

Chaque clinicien a fourni 10 échantillons dans chaque catégorie (santé, gingivite, parodontite), en respectant une fourchette d'âge (35-50 ans) et un *sex ratio* équilibré. Les données cliniques concernant les échantillons ont été transmises de manière anonyme et sans contenir de données dites « sensibles », comme validé par le Comité d'Ethique de la Recherche de l'Université Autonome de Madrid. En parallèle, les films correspondant au diagnostic microscopique, aussi anonymisés, ont été transmis et font l'objet d'un traitement informatique.

**Portée :** une biobanque est constituée pour PERIDYSSEQ et reste disponible pour la communauté scientifique.

### Tâche 2 : Séquençage « Next Generation » (NGS) de tous les règnes du vivant

Dans le but d'analyser de manière non-biaisée et quantitative la flore microbienne dans les échantillons, une méthode d'identification des espèces la plus large possible a été proposée. Il s'agit d'un séquençage de régions variables des ARNr 16s/18s, permettant de différencier une très grande majorité d'espèces de tous les règnes du vivant (eucaryotes, bactéries, archées). Afin d'améliorer la précision de l'identification, la profondeur de lecture a été accrue en employant un séquençage indépendant pour chaque règne. Cependant, le résultat ainsi obtenu est relatif à l'intérieur de chaque règne et ne permet pas de comparer l'abondance d'espèces appartenant à des règnes différents. Pour ce faire, une quantification relative de la totalité des individus de chaque règne est effectuée par PCR quantitative en temps réel et rapportée à la masse de l'échantillon (par exemple : il y a  $10^8$  bactéries par mg de plaque et  $10^6$  parasites par mg de plaque). Cela permet de pondérer la quantification de chaque espèce à l'intérieur de son règne par NGS (par exemple : il y a 10% de *Corynebacterium matruchotii* parmi les bactéries et 50% d'*Entamoeba gingivalis* parmi les eucaryotes. Donc il y a  $10^6$  *C. matruchotii* et  $5 \times 10^5$  *Entamoeba gingivalis* par mg de plaque). Des séquences ne correspondent à aucune espèce microbienne identifiée : elles sont conservées et un identifiant unique leur est attribué.

**Portée :** une banque de données par échantillon est constituée, reportant (i) l'état de santé/maladie, (ii) chaque espèce microbienne et son abondance, et (iii) les séquences non-attribuées à une espèce mais détectées et leur abondance. Elle sera rendue publique avec un premier article en cours de rédaction, qui permettra à la communauté des chercheur·e·s de profiter de ces données.

### Tâche 3 : Identification d'espèces d'intérêt

Dans le but d'identifier l'association d'une espèce à l'état de santé, deux traitements statistiques complémentaires sont conduits. Pour différencier si une espèce témoigne d'une différence entre un état de santé et un autre, un test ANOVA est effectué. Enfin, un test de comparaison des moyennes (test T de Student) permet d'identifier entre quels groupes précis existe une différence significative.

**Portée :** On conclut par espèce si elles sont discriminantes (positivement ou négativement) d'un état de santé ou de maladie. Ce résultat permettra de mettre en évidence quels sont les entités microbiennes les plus pertinentes pour effectuer des tests diagnostiques ciblant une seule (ou un nombre limité d'espèce(s)).

### Tâche 4 : Identification de profils microbiens d'intérêt

La parodontite étant une maladie à biofilm, il est attendu que les espèces microbiennes varient de manière étroitement liée si elles font partie du même environnement. Ainsi, les variations individuelles seront estompées par le poids du groupe. L'analyse discriminante linéaire a fait ses preuves dans l'identification de profils de biomarqueurs dans d'autres contextes infectieux, comme nous l'avons fait avec la maladie de Chagas (Poveda *et al.*, 2014; Santi-Rocca *et al.*, 2017; Santi-Rocca *et al.*, 2019).

**Portée :** on peut déterminer quels sont les espèces ayant une importance pour la classification en trois états de santé. Ceci revêt une importance particulière pour mieux comprendre les résultats d'analyses génétiques du microbiome actuellement effectuées pour les cabinets dentaires et de proposer des stratégies plus efficaces au niveau diagnostique.

## Objectif 2 : Définir les interactions élémentaires dans les communautés microbiennes

Le précédent objectif se base sur un modèle d'étude impliquant un parfait diagnostic clinique et une parfaite correspondance entre clinique et microbiologie. Cependant, le diagnostic clinique se base sur la détection d'une activité histotoxique et ostéolytique passée, et éventuellement toujours en cours, en d'autres termes le constat tardif de dommages irréversibles au niveau tissulaire et osseux. La classification courante en 3 états de santé oppose la santé aux maladies parodontales (gingivite et parodontite). Cette classification peut être complétée en ajoutant des critères physiopathologiques de l'infection, notamment des composantes temporelles ou cliniques, par exemple : « parodontite agressive », « parodontite chronique », « parodontite juvénile » ou « gingivite ulcéro-nécrosante ». Enfin, la nouvelle classification internationale reprend 4 stades et 3 grades, ce qui constitue une classification bidimensionnelle, cependant définie uniquement par l'évaluation clinique basée sur des dommages existants (Tonetti *et al.*, 2018).

Le diagnostic microbiologique, quant à lui, consiste en l'identification d'organismes pathogènes présents, et donc à l'évaluation d'un risque instantané/en temps réel. Par ailleurs, la classification en 3 états de santé est une approximation qui ne révèle pas l'intégralité des paramètres analysés et il est probable que, parmi les différents types proposés de parodontite au niveau microbiologique (Offenbacher *et al.*, 2016), tous ne soient pas différenciables dans un espace unidimensionnel. L'Objectif 2 consiste donc à remodeler la définition des stades de la maladie pour qu'ils reflètent une réalité microbiologique et donc des options thérapeutiques.

### Tâche 1 : Définition des associations absolues entre espèces

Dans un premier temps, les espèces en association seront définies indépendamment de l'état de santé, donc sur la totalité des échantillons sans inférer de groupement. L'analyse en composantes principales et l'analyse factorielle des correspondances permettront de d'identifier quelles sont les espèces microbiennes fortement associées et de dégager des « clusters » d'intérêt, selon une logique non supervisée, complétant ainsi les données pionnières jusqu'à présent non révisées (Socransky *et al.*, 1998). En utilisant ces nouvelles dimensions (composantes principales), les mêmes analyses univariées et multivariées que dans l'Objectif 1 seront lancées et permettront d'apprécier la pertinence des clusters dans la maladie.

**Portée :** Ces clusters reflèteront des unités spatio-temporelles de communautés microbiennes et l'absence de classification préalable permettra de s'affranchir du biais introduit par la conversion d'un état probablement continu ou multi-dimensionnel de la santé vers la maladie en trois états discrets : santé, gingivite, parodontite.

### Tâche 2 : Définition des environnements infectieux

Afin de ne pas travailler à partir d'un modèle hypothétique confondant état de santé et contexte infectieux, nous étudierons, grâce à des méthodes statistiques d'apprentissage non-supervisé, l'existence de plusieurs environnements microbiens dans un espace multidimensionnel. Le nombre de groupes et la qualité de ces dimensions sont définis par

cette analyse, en se basant notamment sur un partitionnement en k-moyennes ou par oligodendrogrammes.

**Portée :** Une analyse de la distribution des organismes ou des groupes d'organismes définis dans la Tâche 1 de l'Objectif 2 (O2T1) reliera cette classification à sa signification clinique. Il est attendu que celle-ci intègre les précédentes classifications et qu'elle les complète en unifiant les paramètres utilisés pour les définir.

### Tâche 3: Identification d'interactions spécifiques dans certaines niches infectieuses

Des espèces microbiennes peuvent présenter des affinités pour certaines autres, permettant leur recrutement et leur interaction. On sait, par exemple, que *Fusobacterium nucleatum* sert d'adaptateur entre un biofilm composé alors de bactéries aérobies et de nouvelles espèces anaérobies qui peuvent alors être recrutées (Bradshaw *et al.*, 1998). Ces espèces sont donc des « charnières » entre plusieurs groupes et apparaîtront liées à plusieurs environnements, donc éventuellement non-spécifiques d'un contexte (O1T4), alors qu'elles le sont de plusieurs. Les échantillons de plaque étant constitués de plusieurs micro-environnements indifférenciés, les analyses ont tendance à mésestimer la spécificité ou au contraire l'aspect ubiquitaire de certains organismes. Les analyses effectuées en O2T1 seront répétées sur les microbiomes des différents contextes infectieux définis en O2T2, ce qui permettra d'identifier des interactions entre espèces spécifiques de micro-environnements tout en s'affranchissant de l'hétérogénéité de l'échantillon et de la variabilité entre échantillons.

**Portée :** Cette analyse originale permettra de définir sans *a priori* des interactions spatio-temporelles plus fines, comme celles observées dans les micro-environnements par microscopie (Mark Welch *et al.*, 2016).

Objectif de l'étude complémentaire : Analyser la matière sombre biologique

Le microbiome parodontal a été presque exclusivement décrit au niveau bactérien, d'où les controverses sur la présence d'autres organismes chez les sujets sains ou malades. Presque tous les efforts pour la recherche expérimentale *in vivo* et *in vitro* ont été concentrés sur une seule espèce, *Porphyromonas gingivalis*, alors qu'environ 50% de l'information génétique est d'origine inconnue dans l'environnement parodontal sain ou malade (Deng *et al.*, 2017). Nous proposons d'étudier cette « matière sombre biologique » et d'offrir une nouvelle description du microbiote.

## Plan de financement, financeurs, faisabilité et déroulement

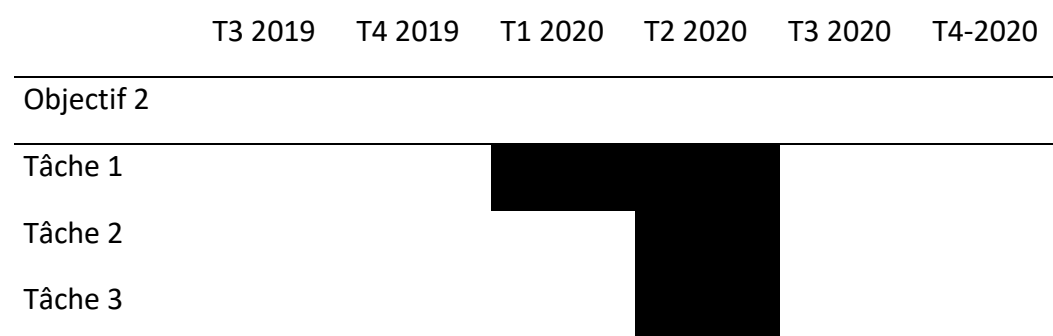
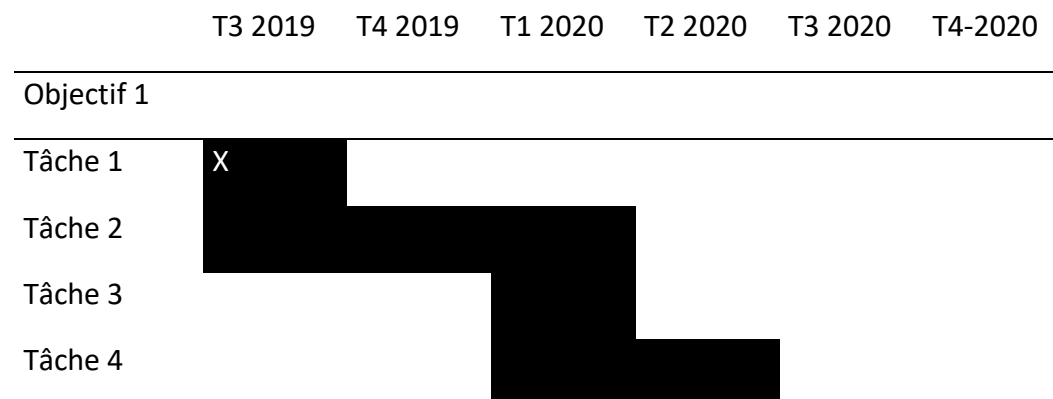
Le projet PERIDYSSEQ a été financé dans son intégralité par l'association « AMIB » (Association Médicale contre les Infections Buccales), qui promeut la santé dentaire notamment à travers la recherche scientifique. L'impact et la visibilité des résultats du programme de recherche présentés ci-dessus seront considérablement amplifiés par le déploiement de l'Objectif complémentaire sur l'analyse de la matière sombre.

### Financement O1 et O2

Le financement d'O1 et O2 a déjà été obtenu dans son intégralité et est géré par la Fundación Severo Ochoa, à Madrid.

Tâche	Poste	Quantité	Montant
O1T1	Collecte	200 éch.	1.500
O1T2	Séquençage	150 éch.	40.000
O1T3-O2T1	Analyse	6 mois	12.000
Publication	Article	1 art.	2.500
<b>Total</b>			<b>56.000€</b>

### Calendrier et jalons





## Avancée du projet

### Aspects éthiques

Le projet présenté a été approuvé par le Comité d’Ethique de la Recherche de l’Université Autonome de Madrid le 14 octobre 2019, sous la référence CEI-101-1907. Tous les aspects du projet ici présenté sont couverts par cette autorisation.

### Objectif 1 Tâche 1

La totalité des échantillons a été obtenue. Ils sont conservés au CBMSO à Madrid.

Les fiches correspondant aux données cliniques des patient·e·s ont toutes été reçues et vérifiées. Elles sont bien anonymisées et conservées sur un serveur sécurisé, en plus de la copie conservée par le·la praticien·ne. En cas de demande expresse par le·la patient·e, ces données peuvent être immédiatement détruites, grâce à un système de référencement et d’anonymisation.

Des vidéomicroscopies de la plaque dentaire des patient·e·s, référencées et anonymisées de la même manière ont été transmises et stockées sur un serveur sécurisé. Cette démarche était approuvée par le Comité d’Ethique précédemment cité et ces données sont utilisées pour un traitement informatique, non-décrit ici.

### Objectif 1 Tâche 2

Après différents essais, le séquençage des échantillons a commencé au Parc Scientifique de Madrid (PCM), à proximité et en collaboration étroite avec le CBMSO. Les résultats sont conformes à nos attentes et cette phase est en cours.

### Objectif 1 Tâche 3

Bien que la totalité des échantillons n’ait pas encore été séquencée, une pré-analyse sur quelques échantillons (25) a été effectuée, pour vérifier la validité de nos outils. Les résultats obtenus sont conformes avec les données de la littérature et a permis de confirmer notre stratégie avant d’engager des dépenses lourdes.

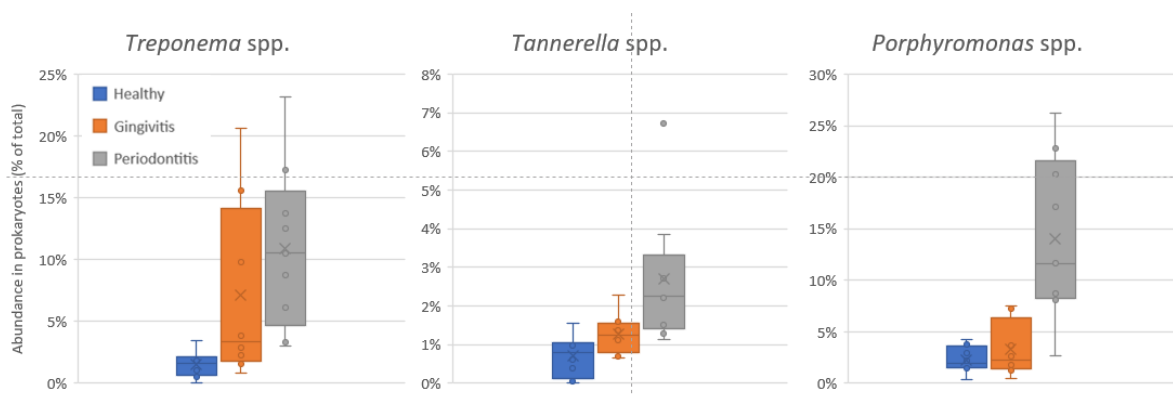


Figure 1 : Abondance des genres du « complexe rouge » dans la santé (bleu), gingivite (orange) et parodontite (gris). Abondance relative calculée par rapport à la totalité des bactéries présentes.

Objectif 1 Tâche 4, Objectif 2 Tâche 1 et Objectif 2 Tâche 3

L'analyse discriminante linéaire et l'analyse factorielle des correspondances sont des méthodologies que nous maîtrisons et que nous avons déjà employé pour d'autres analyses, notamment celles publiées (Poveda *et al.*, 2014; Santi-Rocca *et al.*, 2017; Santi-Rocca *et al.*, 2019).

Objectif 2 Tâche 2

L'analyse non-supervisée des données métataxonomiques n'a pas débuté à cause du nombre trop faible d'échantillons séquencés à ce jour. En revanche, nous avons étudié, à partir de 133 vidéomicroscopies, l'abondance en morphotypes microbiens dans les échantillons dans deux buts : (i) tester nos outils avant l'analyse des séquences et (ii) étudier la validité des outils microscopiques pour l'analyse clinique.

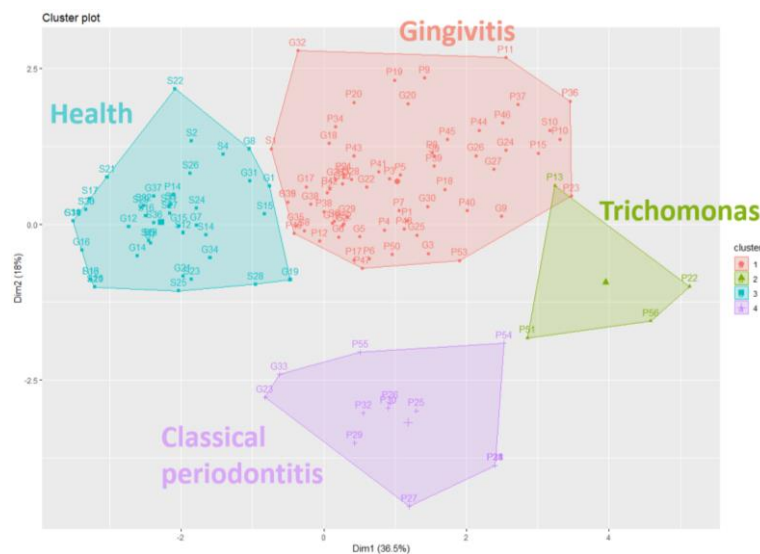


Figure 2 : Distribution non-supervisée des échantillons sur des critères microscopiques. L'abondance en bacilles, coques, filaments, spirochètes, vibrions, amibes, trichomonades, leucocytes, cellules énucléées, ainsi que la mobilité bactérienne ont été prises en compte pour l'analyse. Il est à noter que 4 groupes d'environnements microbiens ont été définis (santé, gingivite, parodontite et infection par trichomonades) et ne correspondent pas exactement au diagnostic clinique de santé (échantillons marqués « S »), gingivite (« G ») ou parodontite (« P »).

Les résultats présentés dans la Figure 2 seront publiés dans un article scientifique, probablement avec les données du projet présenté ici. Cette pré-analyse a permis de confirmer non-seulement la validité des outils mais aussi l'intérêt de développer ce concept pour une application touchant à la santé publique.

Objectif complémentaire : analyse de la matière sombre.

Une fois les précédents défis statistiques relevés, la difficulté réside dans la capacité à identifier les séquences provenant de la « matière sombre biologique ». Pour ce faire, ce projet a intégré des experts en Biologie Moléculaire (Pr Fresno, Dre Guillén, Dre Gironès, Dr Santi-Rocca et Dr Callejas-Hernández), en particulier spécialistes de l'identification *de novo* de séquences génomiques et de l'analyse d'homologies (Clark *et al.*, 2007; Santi-Rocca *et al.*, 2008; Solis and Guillen, 2008; Weber *et al.*, 2008; Zamorano *et al.*, 2008; Solis *et al.*, 2009;

Weber *et al.*, 2009; Tovy *et al.*, 2011; Lopez-Rosas *et al.*, 2012; Santi-Rocca *et al.*, 2012; Hon *et al.*, 2013; Hernandez-Cuevas *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2016; Callejas-Hernandez *et al.*, 2018a; Callejas-Hernandez *et al.*, 2018b; Lopez-Rosas *et al.*, 2018; Callejas-Hernandez *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2019). Profitant de ce savoir-faire déjà démontré et de la proximité des services de génomique de l'Institut Pasteur, du CBMSO et de l'UAM, ainsi que de l'expertise du Parc Scientifique de Madrid, cet objectif pourra être mené à terme si un financement le permet.

## Description du projet après son financement par le prix.

Aller plus en profondeur pour **développer des outils originaux de diagnostic non conventionnel**, basés sur des méthodologies sans a priori.

### Futur du projet au niveau scientifique

Financement de l'Objectif complémentaire sur la matière sombre.

Le financement par l'Association Crédit Mutuel Professions de Santé serait un soutien essentiel pour développer une recherche dirigée en France et effectuée en Europe dans un domaine universel de la santé. Cette opportunité de financement permettrait d'**approfondir une étude** déjà en cours, dont les résultats préliminaires sont prometteurs et confirment le caractère innovant et pionnier de ce projet. Il est à noter que la structure mixte (public, privé et associatif) et internationale de l'équipe est un frein relatif pour des financements conventionnels pour lesquels les critères sont très restrictifs. Pour cette raison, le financement des deux premiers objectifs de l'étude a été assuré par une association de dentistes français-es convaincue de l'intérêt de cette étude.

Une fois le financement obtenu, l'Objectif complémentaire tel qu'il est décrit sera atteint en engageant plusieurs mois d'études bio-informatiques et statistiques. Enfin, au moins un article sera soumis pour une **publication dans un journal scientifique international à fort facteur d'impact**, qui est payante et que le Prix permettrait de financer. Au cas où la publication de plusieurs articles serait possible, le nom des institutions participant au financement comme l'Association Crédit Mutuel Professions de Santé seraient mentionnés dans toutes ces publications.

### Perspectives et innovations

L'équipe de chercheur·e·s du CBMSO à Madrid, avec Julien Santi-Rocca, a publié plusieurs articles originaux mettant en œuvre l'utilisation de **biomarqueurs** et de méthodologies multivariées pour le diagnostic (Poveda *et al.*, 2014; Santi-Rocca *et al.*, 2017; Santi-Rocca *et al.*, 2019). En fonction des résultats obtenus lors des analyses, un effort particulier sera porté à la traduction des résultats en **stratégies innovantes** pour la santé publique. Il est à noter que, dans le domaine de la parodontite, malgré une recherche active, les solutions thérapeutiques et diagnostiques n'ont guère évolué depuis un siècle, si ce n'est par le diagnostic moléculaire des espèces dites « périodontopathogènes » définies relativement récemment (Socransky *et al.*, 1998). Nous proposons donc de fournir des **résultats originaux**, notamment grâce à l'objectif complémentaire de ce projet, qui permettront certainement d'innover et de **développer de nouveaux produits** pour la prise en charge des maladies parodontales.

### Impact attendu des résultats

Impact technique scientifique-social et/ou économique

Les objectifs du projet sont fortement liés à la santé humaine ; ainsi, nous nous attendons à d'importants impacts scientifiques, sociaux et économiques.

Les professionnels de santé publique ont besoin de résultats scientifiques pour **prévenir** ou **guérir** la parodontite et ainsi éviter le coût de ses conséquences : l'édentulisme et les

**pathologies associées** comme le diabète ou les maladies cardiovasculaires. Nos résultats peuvent établir de nouveaux liens entre certaines espèces microbiennes et la parodontite.

Le **rôle clef des protozoaires**, combinés aux bactéries, renverserait totalement les croyances actuelles sur l'étiologie de la parodontite. Cette controverse pourrait être la première étape d'un **changement de paradigme fondamental** sur le chemin vers la guérison.

Nous proposons ici une approche métataxonomique complète avec un nombre conséquent d'individus, permettant une **caractérisation précise de la santé et de la maladie**, considérant plusieurs aspects complémentaires. L'introduction de la **gingivite** dans la description de la pathophysiologie de la maladie parodontale est une clé de voûte qui permettra à la communauté scientifique de déchiffrer les différentes **étapes** de l'évolution vers la parodontite. En effet, la plupart des études excluent cette modalité et les analyses reflètent des réalités distinctes sans les états intermédiaires qui permettraient d'expliquer certains éléments physiopathologiques.

Une autre **application** transversale directe de ce projet serait de faire un test de **diagnostic multiparamétrique**, comme nous l'avons déjà proposé dans le contexte de la maladie de Chagas (Santi-Rocca *et al.*, 2017; Santi-Rocca *et al.*, 2019), ou pour cibler un marqueur spécifique de la maladie, qui n'a pas encore été découvert en raison des méthodologies biaisées employées jusqu'à présent.

#### Diffusion

Nous nous attendons à obtenir des résultats scientifiques pertinents dans ce projet, nous croyons qu'il a un potentiel de traduction important. Nous prévoyons de **publier** les résultats dans des revues à **fort indice d'impact** dans les domaines de la génomique, de la dentisterie, de la parasitologie ou de la microbiologie. Nous publierons exclusivement dans des revues **en libre accès** pour atteindre un nombre maximal de lecteurs et accroître la visibilité de nos résultats, dans l'espoir d'améliorer la santé humaine.

#### Conclusion

Le projet PERIDYSSEQ se verrait **renforcé par le financement** de l'Association Crédit Mutuel Professions de Santé, qui serait **utilisé dans son intégralité pour de la production scientifique et sa publication**. Les perspectives en santé publique sont prometteuses, génératrices d'**innovations** en termes de traitement et prévention. La formation initiale des chirurgiens-dentistes pourrait être totalement remise en cause. En fonction des résultats, l'Association Crédit Mutuel Professions de Santé se verrait citée dans une ou plusieurs publications de qualité. L'originalité de ces publications laisse entrevoir un impact fort au sein de la communauté scientifique et auprès du grand public, et les résultats préliminaires renforcent la **confiance d'atteindre les objectifs fixés**.

## Bibliographie

- Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., and Dewhirst, F.E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43, 5721-5732.
- Barrett, M. (1914). The protozoa of the mouth in relation to pyorrhea alveolaris. *Dent Cosm* 56, 948-953.
- Benabdalkader, S., Andreani, J., Gillet, A., Terrer, E., Pignoly, M., Chaudet, H., Aboudharam, G., and La Scola, B. (2019). Specific clones of *Trichomonas tenax* are associated with periodontitis. *PLoS One* 14, e0213338.
- Bisson, C., Lec, P.H., Blique, M., Thilly, N., and Machouart, M. (2018). Presence of trichomonads in subgingival biofilm of patients with periodontitis: preliminary results. *Parasitol Res* 117, 3767-3774.
- Blasco-Baque, V., Garidou, L., Pomie, C., Escoula, Q., Loubieres, P., Le Gall-David, S., Lemaitre, M., Nicolas, S., Klopp, P., Waget, A., Azalbert, V., Colom, A., Bonnaure-Mallet, M., Kemoun, P., Serino, M., and Burcelin, R. (2017). Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut* 66, 872-885.
- Bonner, M., Amard, V., Bar-Pinatel, C., Charpentier, F., Chatard, J.M., Desmuyck, Y., Ihler, S., Rochet, J.P., Roux De La Tribouille, V., Saladin, L., Verdy, M., Girones, N., Fresno, M., and Santi-Rocca, J. (2014). Detection of the amoeba *Entamoeba gingivalis* in periodontal pockets. *Parasite* 21, 30.
- Bradshaw, D.J., Marsh, P.D., Watson, G.K., and Allison, C. (1998). Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun* 66, 4729-4732.
- Branchereau, M., Reichardt, F., Loubieres, P., Marck, P., Waget, A., Azalbert, V., Colom, A., Padmanabhan, R., Iacovoni, J.S., Giry, A., Terce, F., Heymes, C., Burcelin, R., Serino, M., and Blasco-Baque, V. (2016). Periodontal dysbiosis linked to periodontitis is associated with cardiometabolic adaptation to high-fat diet in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 310, G1091-1101.
- Cembranelli, S.B., Souto, F.O., Ferreira-Paim, K., Richinho, T.T., Nunes, P.L., Nascentes, G.A., Ferreira, T.B., Correia, D., and Lages-Silva, E. (2013). First evidence of genetic intraspecific variability and occurrence of *Entamoeba gingivalis* in HIV(+)/AIDS. *PLoS One* 8, e82864.
- Chaffee, B.W., and Weston, S.J. (2010). Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 81, 1708-1724.
- Consortium, H.M.P. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207-214.
- Darveau, R.P. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 8, 481-490.
- Demmer, R.T., and Papapanou, P.N. (2010). Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 53, 28-44.
- Deng, Z.L., Szafranski, S.P., Jarek, M., Bhujra, S., and Wagner-Dobler, I. (2017). Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep* 7, 3703.
- Deng, Z.L., Sztajer, H., Jarek, M., Bhujra, S., and Wagner-Dobler, I. (2018). Worlds Apart - Transcriptome Profiles of Key Oral Microbes in the Periodontal Pocket Compared to Single Laboratory Culture Reflect Synergistic Interactions. *Front Microbiol* 9, 124.
- Dominy, S.S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L.J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M.I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., Walker, G.D., Reynolds, E.C., Faull, R.L.M., Curtis, M.A., Dragunow, M., and Potempa, J. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv* 5, eaau3333.
- Dumitrescu, A.L. (2016). Depression and Inflammatory Periodontal Disease Considerations-An Interdisciplinary Approach. *Front Psychol* 7, 347.

- Eke, P.I., Dye, B.A., Wei, L., Slade, G.D., Thornton-Evans, G.O., Borgnakke, W.S., Taylor, G.W., Page, R.C., Beck, J.D., and Genco, R.J. (2015). Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* 86, 611-622.
- Eke, P.I., Wei, L., Thornton-Evans, G.O., Borrell, L.N., Borgnakke, W.S., Dye, B., and Genco, R.J. (2016). Risk Indicators for Periodontitis in US Adults: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* 87, 1174-1185.
- Evaluation, I.F.H.M.A. (2016). "Global Burden of Disease Study 2015. Global Burden of Disease Study 2015 (GBD 2015) Disability Weights". (Seattle, United States).
- Feres, M., Teles, F., Teles, R., Figueiredo, L.C., and Faveri, M. (2016). The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontol 2000* 72, 30-53.
- Garcia, G., Ramos, F., Martinez-Hernandez, F., Hernandez, L., Yanez, J., and Gaytan, P. (2018). A new subtype of *Entamoeba gingivalis*: "E. gingivalis ST2, kamaktli variant". *Parasitol Res* 117, 1277-1284.
- Gibbons, R.J., Hay, D.I., Cisar, J.O., and Clark, W.B. (1988). Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect Immun* 56, 2990-2993.
- Gibbons, R.J., and Van Houte, J. (1973). On the formation of dental plaques. *J Periodontol* 44, 347-360.
- Gros, G. (1849). Fragments d'helminthologie et de physiologie microscopique. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou* 22, 549-573.
- Hajishengallis, G., and Lamont, R.J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* 27, 409-419.
- Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M.A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M.A., Mcintosh, M.L., Alsam, A., Kirkwood, K.L., Lambris, J.D., Darveau, R.P., and Curtis, M.A. (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* 10, 497-506.
- Herrero, E.R., Fernandes, S., Verspecht, T., Ugarte-Berzal, E., Boon, N., Proost, P., Bernaerts, K., Quirynen, M., and Teughels, W. (2018). Dysbiotic Biofilms Deregulate the Periodontal Inflammatory Response. *J Dent Res* 97, 547-555.
- Hill, A.B. (1965). The Environment and Disease: Association or Causation? *Proc R Soc Med* 58, 295-300.
- Hsu, C.C., Hsu, Y.C., Chen, H.J., Lin, C.C., Chang, K.H., Lee, C.Y., Chong, L.W., and Kao, C.H. (2015). Association of Periodontitis and Subsequent Depression: A Nationwide Population-Based Study. *Medicine (Baltimore)* 94, e2347.
- Hunter, M.C., Pozhitkov, A.E., and Noble, P.A. (2016). Microbial signatures of oral dysbiosis, periodontitis and edentulism revealed by Gene Meter methodology. *J Microbiol Methods* 131, 85-101.
- Inglis, T.J. (2007). Principia aetiologica: taking causality beyond Koch's postulates. *J Med Microbiol* 56, 1419-1422.
- Jakubovics, N.S. (2010). Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. *Mol Oral Microbiol* 25, 4-14.
- Kartulis, S. (1893). Muskelparasiten beim Menschen. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 13, 2.
- Kirst, M.E., Li, E.C., Alfant, B., Chi, Y.Y., Walker, C., Magnusson, I., and Wang, G.P. (2015). Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Appl Environ Microbiol* 81, 783-793.
- Kolenbrander, P.E., and Celesk, R.A. (1983). Coaggregation of human oral Cytophaga species and *Actinomyces israelii*. *Infect Immun* 40, 1178-1185.
- Leira, Y., Seoane, J., Blanco, M., Rodriguez-Yanez, M., Takkouche, B., Blanco, J., and Castillo, J. (2017). Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 32, 43-53.
- Lertpimonchai, A., Rattanasiri, S., Arj-Ong Vallibhakara, S., Attia, J., and Thakkinstian, A. (2017). The association between oral hygiene and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Dent J* 67, 332-343.

- Li, F., Zhu, C., Deng, F.Y., Wong, M.C.M., Lu, H.X., and Feng, X.P. (2017). Herpesviruses in etiopathogenesis of aggressive periodontitis: A meta-analysis based on case-control studies. *PLoS One* 12, e0186373.
- Li, J., Helmerhorst, E.J., Leone, C.W., Troxler, R.F., Yaskell, T., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., and Oppenheim, F.G. (2004). Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 97, 1311-1318.
- Listgarten, M.A. (1976). Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 47, 1-18.
- Löe, H., Theilade, E., and Jensen, S.B. (1965). Experimental gingivitis in man. *Journal of periodontology* 36, 177-187.
- Loesche, W.J. (1979). Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res* 58, 2404-2412.
- Lopez, R., Ramirez, V., Marro, P., and Baelum, V. (2012). Psychosocial distress and periodontitis in adolescents. *Oral Health Prev Dent* 10, 211-218.
- Manrique-Corredor, E.J., Orozco-Beltran, D., Lopez-Pineda, A., Quesada, J.A., Gil-Guillen, V.F., and Carratala-Munuera, C. (2019). Maternal periodontitis and preterm birth: Systematic review and meta-analysis. *Community Dent Oral Epidemiol* 47, 243-251.
- Mark Welch, J.L., Rossetti, B.J., Rieken, C.W., Dewhirst, F.E., and Borisy, G.G. (2016). Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E791-800.
- Marsh, P.D. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 8, 263-271.
- Marsh, P.D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149, 279-294.
- Marsh, P.D., Moter, A., and Devine, D.A. (2011). Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol* 2000 55, 16-35.
- Marty, M., Lemaitre, M., Kemoun, P., Morrier, J.J., and Monsarrat, P. (2017). *Trichomonas tenax* and periodontal diseases: a concise review. *Parasitology* 144, 1417-1425.
- Meuric, V., Le Gall-David, S., Boyer, E., Acuna-Amador, L., Martin, B., Fong, S.B., Barloy-Hubler, F., and Bonnaure-Mallet, M. (2017). Signature of Microbial Dysbiosis in Periodontitis. *Appl Environ Microbiol* 83.
- Moore, W.E., Holdeman, L.V., Smibert, R.M., Hash, D.E., Burmeister, J.A., and Ranney, R.R. (1982). Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun* 38, 1137-1148.
- Nascimento, G.G., Leite, F.R.M., Vestergaard, P., Scheutz, F., and Lopez, R. (2018). Does diabetes increase the risk of periodontitis? A systematic review and meta-regression analysis of longitudinal prospective studies. *Acta Diabetol*.
- Nieri, M., Pini Prato, G.P., Giani, M., Magnani, N., Pagliaro, U., and Rotundo, R. (2013). Patient perceptions of buccal gingival recessions and requests for treatment. *J Clin Periodontol* 40, 707-712.
- Offenbacher, S., Divaris, K., Barros, S.P., Moss, K.L., Marchesan, J.T., Morelli, T., Zhang, S., Kim, S., Sun, L., Beck, J.D., Laudes, M., Munz, M., Schaefer, A.S., and North, K.E. (2016). Genome-wide association study of biologically informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. *Hum Mol Genet* 25, 2113-2129.
- Organization, W.H. (2016). "Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015". (Geneva).
- Petersen, P.E., and Ogawa, H. (2005). Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol* 76, 2187-2193.
- Poveda, C., Fresno, M., Girones, N., Martins-Filho, O.A., Ramirez, J.D., Santi-Rocca, J., Marin-Neto, J.A., Morillo, C.A., Rosas, F., and Guhl, F. (2014). Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). *PLoS One* 9, e91154.
- Reynolds, I., and Duane, B. (2018). Periodontal disease has an impact on patients' quality of life. *Evid Based Dent* 19, 14-15.



- Rogers, G.B., and Bruce, K.D. (2012). Exploring the parallel development of microbial systems in neonates with cystic fibrosis. *MBio* 3, e00408-00412.
- Rösel Von Rosenhof, A.J. (1755). *Der monatlich-herausgegebenen Insecten-Belustigung*. Nürnberg: Fleischmann, J.J.
- Rosier, B.T., Marsh, P.D., and Mira, A. (2018). Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J Dent Res* 97, 371-380.
- Santi-Rocca, J., Fernandez-Cortes, F., Chillon-Marin, C., Gonzalez-Rubio, M.L., Martin, D., Girones, N., and Fresno, M. (2017). A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. *Sci Rep* 7, 8893.
- Santi-Rocca, J., Girones, N., and Fresno, M. (2019). Multi-Parametric Evaluation of *Trypanosoma cruzi* Infection Outcome in Animal Models. *Methods Mol Biol* 1955, 187-202.
- Santi-Rocca, J., Weber, C., Guigon, G., Sismeiro, O., Coppee, J.Y., and Guillen, N. (2008). The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cell Microbiol* 10, 202-217.
- Schaudinn, C., Gorur, A., Keller, D., Sedghizadeh, P.P., and Costerton, J.W. (2009). Periodontitis: an archetypical biofilm disease. *J Am Dent Assoc* 140, 978-986.
- Schultz-Hautdt, S., Bruce, M.A., and Bibby, B.G. (1954). Bacterial factors in nonspecific gingivitis. *J Dent Res* 33, 454-458.
- Silva, M.F., Cademartori, M.G., Leite, F.R.M., Lopez, R., Demarco, F.F., and Nascimento, G.G. (2017). Is periodontitis associated with halitosis? A systematic review and meta-regression analysis. *J Clin Periodontol* 44, 1003-1009.
- Slots, J. (2015). Periodontal herpesviruses: prevalence, pathogenicity, systemic risk. *Periodontol 2000* 69, 28-45.
- Smiley, C.J., Tracy, S.L., Abt, E., Michalowicz, B.S., John, M.T., Gunsolley, J., Cobb, C.M., Rossmann, J., Harrel, S.K., Forrest, J.L., Hujoel, P.P., Naraian, K.W., Greenwell, H., Frantsve-Hawley, J., Estrich, C., and Hanson, N. (2015). Evidence-based clinical practice guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc* 146, 525-535.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., and Kent, R.L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134-144.
- Tang, Q., Fu, H., Qin, B., Hu, Z., Liu, Y., Liang, Y., Zhou, L., Yang, Z., and Zhong, R. (2017). A Possible Link Between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent* 37, 79-86.
- Tonetti, M.S., Greenwell, H., and Kornman, K.S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* 89 Suppl 1, S159-S172.
- Van 'T Hof, W., Veerman, E.C., Nieuw Amerongen, A.V., and Ligtenberg, A.J. (2014). Antimicrobial defense systems in saliva. *Monogr Oral Sci* 24, 40-51.
- Van Dyke, T.E. (2017). Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Mol Aspects Med* 58, 21-36.
- Vieira, A.R., and Albandar, J.M. (2014). Role of genetic factors in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 65, 92-106.
- Wang, J., Lv, J., Wang, W., and Jiang, X. (2016). Alcohol consumption and risk of periodontitis: a meta-analysis. *J Clin Periodontol* 43, 572-583.
- Yost, S., Duran-Pinedo, A.E., Krishnan, K., and Frias-Lopez, J. (2017). Potassium is a key signal in host-microbiome dysbiosis in periodontitis. *PLoS Pathog* 13, e1006457.
- Yost, S., Duran-Pinedo, A.E., Teles, R., Krishnan, K., and Frias-Lopez, J. (2015). Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med* 7, 27.
- Zhu, C., Li, F., Wong, M.C., Feng, X.P., Lu, H.X., and Xu, W. (2015). Association between Herpesviruses and Chronic Periodontitis: A Meta-Analysis Based on Case-Control Studies. *PLoS One* 10, e0144319.