UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

ANNEE 2017 2017 TOU3 3059

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement

par

Matthieu MINTY

Le 12 septembre 2017

La salive et la santé : des biomarqueurs aux biocapteurs

Directeur de thèse : Docteur Vincent Blasco Baque

JURY

Président :	Professeur Philippe KEMOUN
1er assesseur :	Professeur Franck DIEMER
2ème assesseur :	Docteur Pierre Pascal POULET
3ème assesseur :	Docteur Vincent Blasco Baque

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

Faculté de Chirurgie Dentaire

DIRECTION

DOYEN
Mr Philippe POMAR

ASSESSEUR DU DOYEN
Mme Sabine JONIOT

CHARGÉS DE MISSION
Mr Karim NASR
Mme Emmanuelle NOIRRIT-ESCLASSAN
Mr Franck DIEMER

PRÉSIDENTE DU COMITÉ SCIENTIFIQUE
Mme Cathy NABET

RESPONSABLE ADMINISTRATIF
Mme Muriel VERDAGUER

HONORARIAT

DOYENS HONORAIRES
Mr Jean LAGARRIGUE +
Mr Jean-Philippe LODTER
Mr Gérard PALOUDIER
Mr Michel SIXOU
Mr Henri SOULET

ÉMÉRITAT

Mr Damien DURAN
Mme Geneviève GRÉGOIRE
Mr Gérard PALOUDIER

PERSONNEL ENSEIGNANT

Section CNU 56 : Développement, Croissance et Prévention

56.01 ODONTOLOGIE PEDIATRIQUE et ORTHOPEDIE DENTO-FACIALE (Mme BAILLEUL- FORESTIER)

ODONTOLOGIE PEDIATRIQUE

Professeurs d'Université : Mme BAILLEUL-FORESTIER, Mr. VAYSSE
Maîtres de Conférences : Mme NOIRRIT-ESCLASSAN, Mme VALERA, Mr. MARTY
Assistants : Mme DARIES, Mme BROUTIN
Adjoint d'Enseignement : Mr. DOMINE,

ORTHOPEDIE DENTO-FACIALE

Maîtres de Conférences : Mr BARON, Mme LODTER, Mme MARCHAL-SIXOU, Mr. ROTENBERG,
Assistants : Mme GABAY-FARUCH, Mme YAN-VERGNES

56.02 PRÉVENTION, ÉPIDÉMIOLOGIE, ÉCONOMIE DE LA SANTÉ, ODONTOLOGIE LÉGALE (Mr.HAMEL)

Professeurs d'Université : Mr. SIXOU, Mme NABET, Mr. HAMEL
Maître de Conférences : Mr. VERGNES
Assistant: Mlle. BARON,
Adjoints d'Enseignement : Mr. DURAND, Mr. ROSENZWEIG

Section CNU 57 : Chirurgie Orale, Parodontologie, Biologie Orale

57.01 CHIRURGIE ORALE, PARODONTOLOGIE, BIOLOGIE ORALE (Mr. COURTOIS)

PARODONTOLOGIE

Maîtres de Conférences : Mr. BARTHET, Mme DALICIEUX-LAURENCIN
Maître de Conférences Associée : Mme VINEL
Assistants: Mr. RIMBERT, Mr. ANDUZE-ACHER
Adjoints d'Enseignement : Mr. CALVO, Mr. LAFFORGUE, Mr. SANCIER, Mr. BARRE, Mme KADDECH,

CHIRURGIE ORALE

Maîtres de Conférences :	Mr. CAMPAN, Mr. COURTOIS, Mme COUSTY
Assistants :	Mme CROS, Mme COSTA-MENDES
Assistant Associé :	Mr. DAUZAT,
Adjoints d'Enseignement :	Mr. FAUXPOINT, Mr. L'HOMME, Mme LABADIE, Mr. RAYNALDI

BIOLOGIE ORALE

Professeur d'Université :	Mr. KEMOUN
Maîtres de Conférences :	Mr. POULET, Mr BLASCO-BAQUE
Assistants :	Mr BARRAGUÉ, Mme DUBOSC, Mr LEMAITRE, Mr. TRIGALOU
Adjoints d'Enseignement :	Mr. SIGNAT, Mr. PUISSOCHET, Mr. FRANC

Section CNU 58 : Réhabilitation Orale

58.01 DENTISTERIE RESTAURATRICE, ENDODONTIE, PROTHESES, FONCTIONS-DYSFONCTIONS, IMAGERIE BIOMATERIAUX (Mr ARMAND)

DENTISTERIE RESTAURATRICE, ENDODONTIE

Professeur d'Université :	Mr. DIEMER
Maîtres de Conférences :	Mr. GUIGNES, Mme GURGEL-GEORGELIN, Mme MARET-COMTESSE
Assistants :	Mr. BONIN, Mr. BUORO, Mme. RAPP, Mr. MOURLAN, Mme PECQUEUR, Mr. DUCASSE
Adjoints d'Enseignement :	Mr. BALGUERIE, Mr. MALLE, Mr. FISSE

PROTHÈSES

Professeurs d'Université :	Mr. ARMAND, Mr. POMAR
Maîtres de Conférences :	Mr. CHAMPION, Mr. ESCLASSAN, Mme VIGARIOS, Mr. DESTRUHAUT
Assistants:	Mr. EMONET-DENAND, Mr. KNAFO, Mme. SELVA, Mme. ROSCA, Mr. LEMAGNER
Adjoints d'Enseignement :	Mr. BOGHANIM, Mr. FLORENTIN, Mr. FOLCH, Mr. GHRENASSIA Mme. LACOSTE-FERRE, Mr. POGEANT, Mr. GINESTE, Mr. CHAMPION, Mr. LE GAC, Mr. GAYRARD, Mr. COMBADAZOU, Mr. HENNEQUIN

FONCTIONS-DYSFONCTIONS , IMAGERIE, BIOMATERIAUX

Maîtres de Conférences :	Mme JONIOT, Mr. NASR, Mr. MONTSARRAT
Assistants:	Mr. CANCEILL, Mme. GARNIER, Mr. OSTROWSKI
Adjoints d'Enseignement :	Mr. AHMED, Mme MAGNE, Mr. VERGÉ, Mme BOUSQUET,

---

Remerciements

A mes parents,

- **A mon papa**, pour m'avoir toujours soutenu aveuglement dans tout ce que j'ai entrepris jusqu'ici, pour m'avoir donné un modèle idéal à suivre, pour tes connaissances et ton éternelle gentillesse.
- **A ma mère**, omniprésente pour moi depuis que je suis né, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, j'espère te rendre fière comme tu me rends fier dans tout ce que tu fais et merci pour le temps passé à corriger mon français perfectible et autres…
- **A mon frère**, t'es la personne que j'aime le plus au monde, que j'idolâtre le plus parce que tu es le meilleur tout simplement frérot, merci pour tout, je n'en serais pas là aujourd'hui sans toi. Je t'aime (même si tu n'es pas là aujourd'hui).

Au Docteur Vincent Blasco, merci pour tout ce que vous faites pour moi depuis le début, je suis heureux et fier de vous avoir rencontré, je vous dois bien plus que vous ne l'imaginez.

A ma deuxième famille, depuis quelques années, merci pour tout,

- **Nono** (Bro), mon colloc, mon meilleur ami, je n'imagine pas faire ma vie sans toi désormais, je veux continuer d'avancer à tes côtés, tu es sans nul doute ma révélation en dentaire (sans faire de jaloux) !!!
- **Laulau**, à mon binôme, meilleure amie, colloc,… et j'en passe, par où commencer, merci de m'avoir supporté toutes ces années, chaque moment passé avec toi est un kiff, je t'aime ma Laulau.
- **Jérem**, t'es un frère maintenant et pour toujours, je ne pensais jamais en arrivant en P2 qu'on serait pote, mais plus je te connais plus je t'aime, t'es un ouf !je ne veux surtout pas te perdre de vue.
- **Jojo**, « ma petite sœur », merci pour ta façon d'être, tu donnes le sourire autour de toi, et surtout à moi. On ne se quittera pas, Guess how long we'll be friends?!
- **Floflo**, ma floflo je ne veux jamais te perdre, t'es la plus belle et la plus « ouf », merci pour tout, je suis trop fier d'être ton ami, j'espère que ça ne s'arrêtera jamais jamais !
- **Caro**, Fajitassss merci pour nos petites discussions et tous tes conseils qui me manquent beaucoup trop en ce moment,t'es beacoup plus importante pour moi que tu ne le crois..
- **Chachou**, tu es la première amie de P1 et j'espère encore pendant de longues années, nos retours d'inté ensemble me manquent, tu es surement une des personnes les plus gentille que je connaisse, mais tu as intérêt à donner des nouvelles de toi plus tard, je te connais…
- **Alan**, tu le sais, je savais que tu allais être mon pote avant notre p2 et je ne m'étais pas trompé, merci pour tous nos rires et discussions.
- **Doud's**, j'espère que l'on ne se perdra jamais de vu, t'es un mec (je vais manquer de place pour te décrire) au top, drole ,bg et surtout de confiance, je te kiff bro,
- **Chlochlo**, ma chlochlo c'est toi la meilleure des meilleures, merci pour le temps passé ensemble à la BU, pour toutes tes explications et nos délires en soirée,
- **Agathou**, Agathou on ne s'est pas trop vu cette année mais je garderai toujours un bon souvenir de toi, j'espère qu'on aura la chance de se voir beaucoup plus cette année !et les suivantes...

A notre président du jury de thèse,

A Monsieur le professeur KEMOUN Philippe

- Professeur des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie
- Docteur en Chirurgie Dentaire,
- Docteur de l'Université Paul Sabatier,
- Habilitation à diriger les recherches (HDR)
- Lauréat de l'Université Paul Sabatier

Je vous remercie sincèrement de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je souhaite également vous exprimer ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance pour m'avoir mis en confiance et m'avoir tout de suite intégré comme membre de votre équipe. Votre simplicité et votre gentillesse m'ont beaucoup touché en comparaison du peu de temps que nous avons passé ensemble.

Je vous prie de bien vouloir trouver ici le témoignage de toute ma gratitude.

A notre jury de thèse,

A Monsieur le Professeur DIEMER Franck

- Professeur des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie
- Responsable de la sous-section d'Odontologie Conservatrice, Endodontie
- Docteur en Chirurgie Dentaire,
- D.E.A. de Pédagogie (Education, Formation et Insertion) Toulouse Le Mirail,
- Docteur de l'Université Paul Sabatier,
- Responsable du Diplôme Inter Universitaire d'Endodontie à Toulouse,
- Habilitation à diriger des recherches (H.D.R.),
- Vice-Président de la Société Française d'Endodontie
- Lauréat de l'Université Paul Sabatier

Je suis très honoré et heureux que vous ayez accepté de faire partie de mon jury de thèse. Vous avez su me donner le goût et l'enthousiasme pour notre métier.

J'ai partagé avec vous nombre d'optionnel depuis mon arrivé à la faculté, non pas, dans un premier temps, pour le sujet choisi mais tout simplement pour être avec vous.

Vous nous avez toujours considérés d'égal à égal malgré la différence de nos savoirs et en cela je vous en suis grandement reconnaissant.

A notre jury de thèse

A Monsieur le Docteur POULET Pierre-Pascal

- Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie,
- Responsable de la Sous-Section Sciences Biologiques,
- Docteur en Chirurgie Dentaire,
- Docteur de l'Université Paul Sabatier,
- Lauréat de l'Université Paul Sabatier.

Je suis très flatté et reconnaissant de votre présence à mon jury de thèse. Vous avez spontanément accepté d'évaluer mon travail et je vous en remercie.

Merci pour votre pédagogie, et vos conseils avisés qu'ils soient théoriques ou cliniques. J'espère avoir la chance de continuer à apprendre à vos côtés et de partager votre expérience d'enseignement et de recherches.

Je vous prie de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A notre directeur de thèse,

A Monsieur le Docteur BLASCO-BAQUE Vincent

- Maître de Conférence Universitaire et Praticien Hospitalier à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse,

- Docteur en Chirurgie Dentaire,

- Master 2 de Recherche en « Physiopathologie des approches expérimentales aux nouvelles Thérapeutiques »

- Docteur de l'Université Paul Sabatier,

- Lauréat de l'Université Paul Sabatier

- Diplôme Inter Universitaire d'Endodontie de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse

- Responsable du Diplôme Inter Universitaire de médecine du sport

C'est pour moi un très grand honneur doublé d'une immense fierté que vous ayez accepté d'être le directeur de ma thèse.

Je ne saurai jamais assez exprimer toute ma gratitude pour votre disponibilité, votre patience, et votre implication sans faille dans ce projet futuriste.

Vous représentez pour moi le modèle à suivre, et j'espère qu'à travers cette thèse j'ai pu vous montrer ma motivation et mon enthousiasme.

Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous avez pu faire pour moi de l'encadrement en clinique à mon intégration dans le monde de la recherche en passant par vos enseignements rugbystiques. Merci de l'enthousiasme qui vous anime dans ce projet, et de la confiance que vous m'accordez.

Enfin merci de m'avoir donné goût à la recherche médicale et de m'avoir poussé à me dépasser. Mes remerciements les plus sincères et amicaux.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 14

1 La salive : un « biofluide » unique 15

1.1 L'origine de la salive 15

1.2 La composition de la salive 15

1.3 L'utilité de la salive pour la santé orale et générale 16

1.4 Fonction de lubrification 17

1.5 Fonction de protection 17

1.5.1 Le pouvoir tampon 17

1.5.2 Le flux salivaire 17

1.5.3 Le réservoir d'ions 18

1.5.4 Les propriétés antibactériennes 19

1.5.5 Le bol alimentaire 20

1.6 Ce que votre salive peut dire de votre santé … 20

2 Les biomarqueurs 21

2.1 Qu'est-ce qu'un biomarqueur ? Sa définition 21

2.2 Historique de quelques biomarqueurs 22

2.3 Développement et validation des biomarqueurs 22

2.4 Types de biomarqueurs 23

2.4.1 Les marqueurs enzymatiques : Définition 23

2.4.2 Deux exemples : 23

2.5 D'autres protéines 25

2.5.1 Etude du protéome 25

2.5.2 Etude de quelques protéines 25

2.6 Des métabolites 26

2.6.1 Définition d'un métabolite 26

2.6.2 Exemple d'étude 27

2.7 Le microbiome et/ou microbiote 27

2.8 Les micro-ARN circulants 29

2.8.1 Définition d'un miRNA 29

2.8.2 Fonctions des miARN 30

3 Méthodes de détection des biomarqueurs 30
3.1 Analyses enzymatiques 30
3.2 Analyses protéomique 31
3.3 Analyses des métabolites 31
3.4 Analyses par PCR 32
3.5 Analyses du microbiome 33
3.6 Analyses des biomarqueurs dans la salive 34
3.6.1 Conditions de prélèvement de la salive stimulée ou non-stimulée 34
3.6.2 La préparation de l'échantillon 35
3.6.3 Le choix des populations à étudier et l'analyse des résultats 35
3.6.3.1 Choix des cohortes 35
3.6.3.2 Evaluation des résultats 36
3.6.4 La corrélation de l'augmentation (ou la diminution) du biomarqueur, ou des biomarqueurs, et l'apparition de la maladie 36
3.7 Biomarqueurs et pathologies 37
3.7.1 Biomarqueurs et pathologies parodontales 37
3.7.2 Biomarqueurs de salive et cancers de la bouche 38
3.7.2.1 Etudes protéomiques 38
3.7.2.2 Etudes sur l'expression génétique 39
3.7.2.3 Choix des cohortes 39
3.7.3 Biomarqueurs de salive et diabètes 40
3.7.3.1 Différents types de diabète 40
3.7.3.2 Dosages de la glycémie 41
3.7.3.3 Validation des techniques 41
4 Les Biocapteurs 42
4.1 Définition 42
4.2 Les différents types de Biocapteurs 42
4.2.1 Choix d'un biocapteur 43
4.2.2 Fonctionnements 43
4.2.3 Différents types de Biocapteurs 44
4.2.4 Autres utilisations des biocapteurs 45
4.3 Biocapteurs du glucose et diabète : Exemples d'objets connectés 45
4.3.1 Une montre : La K'Watch 45

4.3.2 Un tatouage qui change de couleur 46
4.3.3 Les lentilles dotées de biocapteurs 46
4.3.4 Des lectures multiples et connectées 47
5 Projet clinique 48
5.1 Objectifs 49
5.1.1 Objectif principal de l'étude 49
5.1.2 Objectifs secondaires 49
5.2 Matériels et Méthodes 49
5.2.1 La conception de l'étude et critères d'inclusions. 49
5.2.1.1 Choix de notre cohorte 49
5.2.1.2 Critères d'inclusion: 50
5.2.1.3 Caractéristiques biologiques : 50
5.2.1.4 Caractéristiques médicales et sociodémographiques: 50
5.2.1.5 Recueil des données 51
5.2.2 Types d'analyses réalisées 51
5.2.2.1 Analyse des Métabolites 51
5.2.2.2 Analyse enzymatique 52
5.2.2.3 Analyse du microbiote 52
5.3 Résultats 52
5.3.1 Comparaison des paramètres généraux 53
5.3.2 Bilan lipidique salivaire et glycémie sanguine à jeun 54
5.3.3 Bilans lipidiques salivaires et glycémie sanguine à jeun et nourri 57
5.3.4 Résultat de l'Analyse en Composantes Principales (PCA) 59
5.3.5 Dosages microbiologiques 61
5.3.6 Résultats taxonomique du microbiote oral par séquençage de l'ADN salivaire total 62
5.3.6.1 Mâles versus Femelles 62
5.3.6.2 Hommes nourris versus à jeun 65
5.3.6.3 Femmes nourries versus à jeun 68
5.4 Discussion 71
5.4.1 Activités enzymatiques et métaboliques de la salive 71
5.4.2 Le microbiote salivaire 73
5.4.2.1 Modulation par la glycémie 73

5.4.2.2 Biocapteurs et microbiote 74
5.4.3 La dent « connectée » : rêve ou réalité ? 75
Conclusion 77
Annexes 78
Bibliographie 88
Tables des illustrations 98
Figures 98
Tableaux 99

INTRODUCTION

« La salive » : outre ses nombreuses fonctions connues dans l'absorption et la digestion, le rôle qui nous intéresse est son pouvoir de diagnostic médical.

L'avenir de la médecine personnalisée est bien réel, on parle de « **médecine 4 P »** : Prédictive, Préventive, Personnalisée et Participative. Elle passe par une détection universelle, un dépistage généralisé et un traitement s'il s'avère nécessaire, unique, adapté à l'individu et à sa génétique.

L'avancée des nanotechnologies et des nano-puces aux nanocapteurs laisse espérer que dans un futur très proche les patients à risque seront suivis en temps réel et surtout de façon moins invasive. Cela nous permet de rêver à la création d'un nanocapteur biologique, incorporé à une dent au contact de la salive et au service de la santé.

L'intérêt pour les biomarqueurs et pour les biocapteurs dans la salive est en plein essor, mais encore à ses débuts. C'est donc un sujet propice et innovant sur lequel nous nous interrogeons.

Pour tester les capacités détectrices de la salive, nous nous sommes intéressés aux maladies métaboliques, particulièrement au diabète, dont la prévalence a été multipliée par 4 en 35 ans selon l'OMS. En effet, les dépenses ont augmenté de 108 millions de dollars en 1980 à 422 millions de dollars en 2014.

Dans ce travail, nous traiterons tout d'abord de la salive dans sa composition et sa fonction, puis nous étudierons certains biomarqueurs et biocapteurs potentiels ainsi que leurs applications.

Notre dernière partie est une étude clinique pilote portant sur l'évaluation des paramètres salivaires en lien avec la glycémie sanguine. Pour répondre à cet objectif, nous avons étudié une cohorte de 20 patients (10 femelles /10 mâles) avec analyse des paramètres salivaires (biochimiques et du microbiote oral) à jeun et nourris.

Notre travail s'est articulé autour des connaissances sur la salive et de son potentiel de bio-indicateur de la santé afin d'identifier de nouvelles stratégies de médecine personnalisée pour la cavité buccale.

1 LA SALIVE : UN « BIOFLUIDE » UNIQUE

1.1 L'origine de la salive

La salive est un liquide incolore, insipide et légèrement alcalin, qui est continuellement sécrétée, (0,7 à 1 L par jour) (1) (2). Cette sécrétion salivaire est régulée par l'activité des nerfs sympathiques et parasympathiques.
La salive est produite à 90% par les trois glandes salivaires principales (parotides, sous-maxillaires et sublinguales), tandis que les glandes accessoires contribuent à hauteur de 10% de cette sécrétion salivaire. En se déversant directement dans la bouche, la salive a pour fonction d'humecter les muqueuses buccales (langue, joues et pharynx) et joue un rôle mécanique en humectant les aliments, facilitant la mastication et la déglutition du bol alimentaire, ainsi que la phonation.

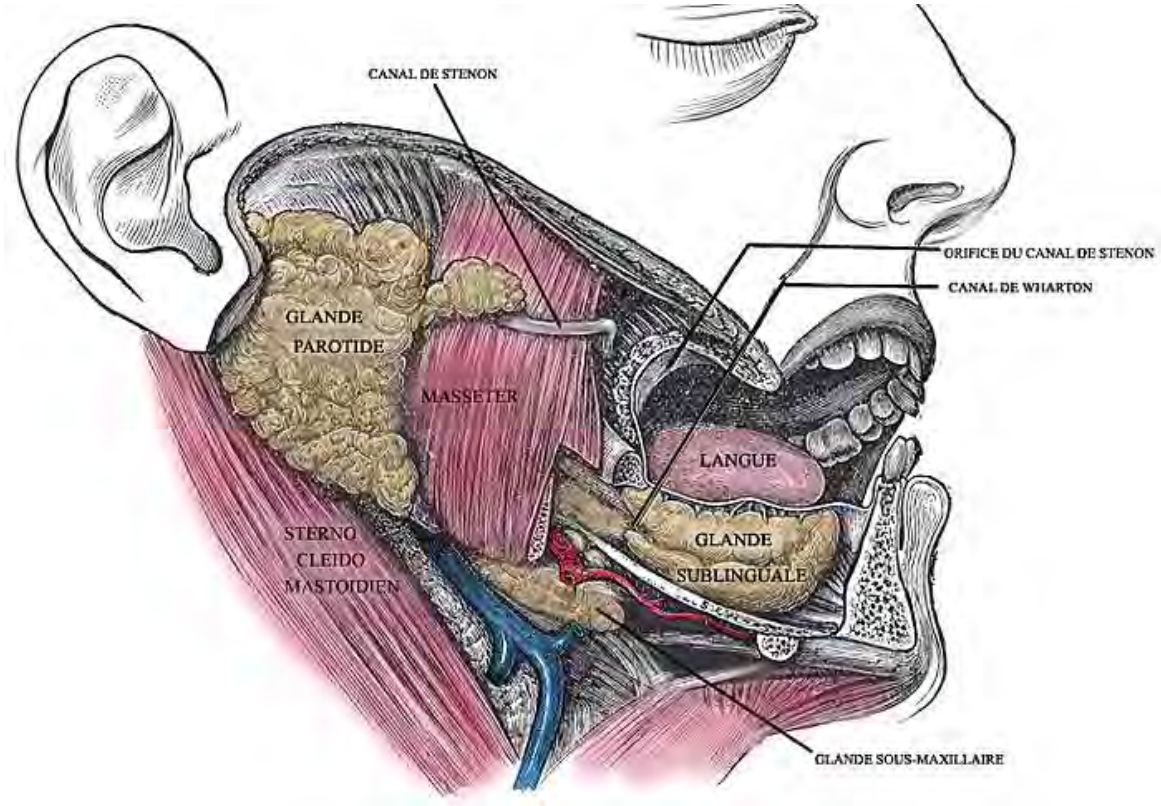


***Figure 1**: Anatomie des glandes salivaires*

1.2 La composition de la salive

La richesse de la composition de la salive pourrait permettre un dépistage de nombreuses pathologies, dépistage plus aisé et moins onéreux à pratiquer que les prises de sang.

Composée à 99% d'eau et de 1% de composés inorganiques, organiques et de protéines, la salive peut devenir isotonique ou bien hypertonique dans certains états pathologiques.

Comparée au plasma sanguin, la composition en sels de la salive varie selon l'état d'activation comme l'indique le tableau ci-dessous (2) :

Ions	Non stimulée (mEq/L)	Stimulée (mEq/L)	Plasma (mEq/L)
Na^+	2.7	54.8	143.3
K^+	46.3	18.7	4.1
Cl^+	31.5	35.9	100.9
HCO_3-	0.6	29.7	27.5

Tableau 1 *: Variation salivaire selon sa composition ionique*

Les analyses des composés organiques de la salive (3) révèlent la présence :

- ✓ d'urée à environ 2mM.
- ✓ de glucose à environ 0.056mM en comparaison avec le plasma qui donne une concentration comprise entre 3.6 et 6.1 mM.
- ✓ de très faibles concentrations d'acide urique, d'acide citrique, d'acides aminés, de créatinine, de cholestérol et de phospholipides.
- ✓ d'hormones, par exemple le dosage de la progestérone salivaire (à faible concentration) sert d'indicateur du cycle menstruel.
- ✓ de molécules d'ARN et d'ADN. Par exemple les dosages de certains des quelques 3000 types d'ARNm présents, permettraient le dépistage d'un marqueur du cancer de la bouche, comme nous allons le voir plus loin.
- ✓ …et de nombreuses protéines dont la majorité est impliquée dans les réactions infectieuses ou les lésions organiques signalées par le corps. On note la présence d'une amylase responsable de la transformation de l'amidon en maltose assimilable, ainsi que d'une lipase linguale, de lysozyme, de protéines riches en proline (PRP)…

1.3 L'utilité de la salive pour la santé orale et générale

La salive, est un biofluide aux multiples fonctions (2) (3) (4):

- ✓ mécanique,
- ✓ d'humidification liée à la lubrification des tissus buccaux, en imprégnant le bol alimentaire, facilitant la mastication et la déglutition.
- ✓ protectrices des dents et des muqueuses jusqu'à l'œsophage, donc des fonctions digestives, en neutralisant l'acidité buccale.
- ✓ des fonctions trophiques pour les dents liées aux fonctions d'élimination et de détoxification de la bouche. (5)

1.4 Fonction de lubrification

La lubrification des tissus buccaux est assurée par les mucines de la salive et les protéines glycosilées (PRP-g). Avec son caractère viscoélastique, la salive maintient un film uniforme sur les tissus mous et durs de la cavité buccale. La dégradation de ce film entraine des ulcérations des muqueuses et ces zones non protégées deviennent très sensibles à l'abrasion.

La salive agit telle une barrière contre :

- les traumatismes occasionnés par la mastication, la déglutition et la phonation des tissus mous,
- les irritants comme les enzymes protéolytiques et hydrolytiques bactériennes d'origine alimentaire ou non (alcool, tabac, produits chimiques…) (4) (5).

Cette lubrification salivaire protège ainsi la substance dentaire. On parle d'un concept de « bouclier salivaire".

1.5 Fonction de protection

Ce concept de bouclier salivaire, protecteur de la santé orale dépendrait des quatre propriétés suivantes : un pouvoir tampon, un flux salivaire, un réservoir d'ions et des propriétés antibactériennes.

1.5.1 Le pouvoir tampon

La salive neutralise l'acidité buccale.

- ✓ L'émail est sensible à un environnement dont le pH est inférieur à son pH critique à l'égard des minéraux dentaires (compris entre 5,5 et 6,5). La régulation du pH de la salive est maintenue par ce pouvoir tampon assuré par la présence de bicarbonates, de phosphates et d'urée.
- ✓ Le bicarbonate joue un rôle tampon important en se diffusant dans la plaque pour neutraliser les attaques acides.
- ✓ L'Urée, après son métabolisme par les uréases bactériennes, se transforme en ammoniaque et dioxyde de carbone qui augmentent le pH de la salive.
- ✓ Des peptides de bas poids moléculaires riches en histidine assurent plus de 90% du pouvoir tampon de la salive. (6)

Ce rôle de tampon inhiberait les phénomènes de déminéralisation et serait aussi important vis-à-vis des chocs thermiques en limitant les dommages sur les muqueuses.

1.5.2 Le flux salivaire

L'augmentation du flux salivaire est corrélée à l'amélioration de la santé buccodentaire de par son rôle de pouvoir tampon, d'où l'importance de stimuler cette production salivaire par divers moyens tels que le bain de bouche, brossage régulier ou par la simple mastication d'un chewing-gum.

Comme nous venons de le voir, il existe un pH critique au-delà duquel l'émail se dissout et on assiste à une déminéralisation. Si le débit salivaire est faible, la susceptibilité aux caries et gingivites augmente parce que le flux ne permet pas la remontée du pH au-delà de ce seuil critique.

Ce volume de sécrétion salivaire est influencé par des facteurs tels que le degré d'hydratation et la position du corps, l'exposition à la lumière, les stimulations antérieures, les rythmes circadiens et circannuels et bien entendu par la taille des différentes glandes salivaires et les médicaments ou drogues absorbés. (7)

Le tableau ci-dessous montre ces variations : (5)

	Sécrétion non stimulée (de repos)	**Sécrétion stimulée acide (gustation)**	**Sécrétion stimulée mécanique (mastication)**	**Sécrétion au cours du sommeil**
Débit moyen	de 0.12-0.16 à 0.3-0.4mL/min	jusqu'à 7mL/min	de 3 à 5 mL/min	environ 20µL/min

***Tableau 2** : Débit salivaire en fonction de sa stimulation*

On voit que la variabilité du flux salivaire est liée aux besoins corporels. Une corrélation a pu être établie entre le nombre de caries et le flux salivaire.

1.5.3 Le réservoir d'ions

Les phénomènes de déminéralisation sont inhibés par le pouvoir tampon de la salive. Le renforcement de la charge minérale de surface est assuré par la sursaturation locale d'électrolytes salivaires : le calcium, les phosphates et le fluor.

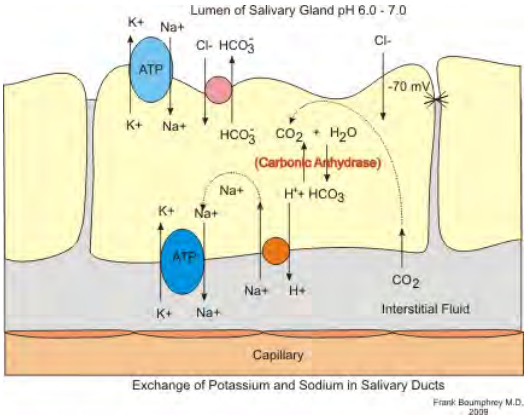


***Figure 2** : Echanges d'électrolytes entre le fluide interstitiel et l'émail*

La figure ci-dessus montre les échanges d'électrolytes entre le fluide interstitiel et l'émail dentaire.

Ces processus de maturation et de reminéralisation des cristaux d'hydroxyapatite de l'émail après une attaque acide sont assurés par la salive qui a cette capacité à former la pellicule exogène acquise en protégeant les tissus dentaires touchés par le processus carieux ou gingivaux. Cet effet protecteur de l'émail via la salive peut être renforcé par l'utilisation de produits contenant du fluor ou du phosphate de calcium qui à pH salivaire, précipitent à la surface des dents, renforçant le composant naturel de la dent. On trouve ces produits sous forme de gels, de vernis, de dentifrices, voire de compresses ou de compléments alimentaires.

1.5.4 Les propriétés antibactériennes

- ✓ La salive est une pièce maitresse dans le dispositif de l'hôte contre toute agression physicochimique, virale, bactérienne et fongique. Des agents immunologiques ou non sont sécrétés par les glandes salivaires conférant à la salive ses propriétés antibactériennes notamment par la présence d'enzymes (lysozyme, lactoperoxydase…), de protéines (mucines, cystatines, histatines…), de thiocyanate et d'immunoglobulines (IgAs, IgG et IgM). Le rôle de médiateur anti inflammatoire est assuré par ces molécules.
- ✓ Le processus antimicrobien :
  - facilite la reconnaissance des éléments pathogènes (par leurs molécules de surface) et des cellules immunitaires entrainant l'agrégation par les mucines et les IgAs de ces germes (bactériens, viraux ou fongiques)
  - et permet leur élimination par la déglutition.
- ✓ L'élimination de cette flore pathogène est assurée par les mouvements mécaniques de la langue et des lèvres et par la lubrification du flux salivaire (5).

En plus de ses activités anti bactériennes et anti inflammatoires, la salive intervient dans la cicatrisation des tissus car elle contient des facteurs de croissance, notamment le *nerve growth factor* (NGF) *et l'epithelial growth factor* (EGF) dont la sécrétion augmenterait au cours de certaines maladies parodontales, des *insulin-like growth factor* (IGF), des cytokines qui peuvent se retrouver dans la salive comme *tumor necrosis factor* (TNF)-α, les interleukines (IL)2, 4, 6, 10,l'interféron (IFN)-γ et *transforming growth factor* (TGF)-β (8).

1.5.5 Le bol alimentaire

- ✓ La salive est indispensable pour la préparation du bol alimentaire et sa déglutition.
- ✓ Les substances mucilagineuses sécrétées par les glandes salivaires accessoires ainsi que les enzymes, telles que l'α-amylase et la lipase sont les éléments déclencheurs de la digestion des sucres et des graisses.
- ✓ Le goût des mets en bouche est la conséquence de l'interaction des enzymes digestives salivaires avec les substances gustatives diverses (minéraux, ions, polysaccharides et acides aminés) contenues dans les aliments. Ces substances interagissent chimiquement avec la salive avant leur fixation aux sites récepteurs du goût.

La salive aurait un rôle de protection des récepteurs gustatifs où l'amylase salivaire jouerait un rôle dans la perception du goût (5).

1.6 Ce que votre salive peut dire de votre santé …

On connait la fonction dépistage du test salivaire dans la détection des produits stupéfiants par exemple mais beaucoup moins bien les applications à caractères de diagnostic.

Mais depuis une dizaine d'années de nouveaux dosages salivaires à caractères biologiques sont validés ou en cours de validation, on parlera pour la salive d'une fonction diagnostic pour la santé d'un individu (9).

Les tests salivaires utilisés pour la détection de médicaments, de drogues, de toxines, d'hormones stéroïdes ou de composants immunologiques ont été validés car les résultats reflètent fidèlement les concentrations retrouvées dans les niveaux tissulaires par les voies classiques de dosage (10).

Il existe des tests pour le diagnostic et l'évaluation des risques vis-à-vis de la maladie carieuse (11), de pathologies et du dysfonctionnement des glandes salivaires et d'infections fongiques.

D'autres applications connues comme la mesure du cortisol dans la salive, qui fournit aux praticiens un moyen fiable d'investigation de l'axe hypotalamo-hypophyso-surrénalien, ou encore comme l'α-amylase salivaire qui a été proposée comme biomarqueur sensible aux changements liés à un stress corporel.

Les tests salivaires sont en train d'acquérir un avantage majeur par le seul fait que cette technique de prélèvement soit non invasive et qu'elle puisse s'effectuer en dehors de toute structure médicalisée.

La salive par ses multiples fonctions, par sa réactivité face aux événements, par sa disponibilité, par la facilité de son prélèvement représentera dans un avenir très proche un domaine de détection, de dépistage pour le diagnostic, la recherche médicale et plus spécialement l'odontologie.

Le but de cette thèse sera de vous convaincre en partageant nos idées et nos quelques résultats préliminaires du grand avenir de la salive et de ses biomarqueurs pour le diagnostic médical.

2 LES BIOMARQUEURS

2.1 Qu'est-ce qu'un biomarqueur ? Sa définition

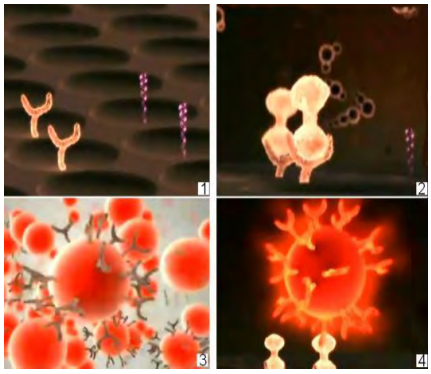


Figure 3 *: Nanotechnologies et Médecine : les biomarqueurs (Chad A. Mirkin, North Western University)*

Dans le domaine médical, un biomarqueur peut être utilisé pour le dépistage, le diagnostic, l'évaluation de la réponse ou de la tolérance à un traitement. Un biomarqueur peut être une molécule (enzyme, hormone, métabolite ...), ou un type de cellule, dont la présence ou la concentration anormale dans le sang, les urines ou la salive signale un évènement ou un statut physiologique particulier.

La découverte d'un biomarqueur part d'une corrélation statistique entre la quantité mesurée du biomarqueur et l'état d'une pathologie. Grâce aux dosages de ce biomarqueur dans un fluide corporel, il est possible de déclencher des interventions préventives ou thérapeutiques susceptibles de réduire la pathologie.

Il est très important de déterminer une valeur seuil pour chaque biomarqueur, à partir de laquelle des actions cliniques seront entreprises. Il est nécessaire d'évaluer la variabilité statistique de la mesure et la variabilité de concentration du biomarqueur.

Il faut insister sur le fait que, pour qu'un biomarqueur soit utile, il n'est pas forcément nécessaire de connaître sa fonction dans la cellule.

Ce concept de biomarqueur n'est pas récent : par exemple, la glycémie, identifiée dès 1848 avec les mesures de taux de glucose, caractérise le diabète et sert à évaluer l'efficacité des médicaments antidiabétiques.

Comme nous allons le voir, le dosage des biomarqueurs peut correspondre à des procédures extrêmement simples, dosage de la glycémie, du cholestérol ou à des procédures beaucoup plus complexes comme l'identification d'une mutation spécifique dans le génome.

2.2 Historique de quelques biomarqueurs

- ✓ La chaîne légère de l'immunoglobuline (IgG) : En 1848, la chaîne légère de l'immunoglobuline (igG) est identifiée comme étant présente dans les urines de 75% des patients atteints d'un myélome par Henry Bence Jones (12). Elle peut également être retrouvée dans la maladie de Waldenstrom et l'amylose AL. Le suivi de son taux permet de contrôler l'efficacité du traitement et l'évolution de ces maladies.
- ✓ L'α-fœtoprotéine et l'antigène carcino-embryonnaire : Les années 1970 ont vu la découverte de l'α-fœtoprotéine et de l'antigène carcino-embryonnaire comme marqueurs des pathologies hépatiques tumorales ou non (13) et (14).
- ✓ CA 125 et PSA : Plus récemment viennent les découvertes du CA 125 comme marqueur dans le cancer de l'ovaire (15) et de l'antigène prostatique spécifique (PSA) dans le cancer de la prostate (16).

La découverte de nouveaux biomarqueurs est souvent liée au développement de nouvelles technologies, par exemple celles de l'α-fœtoprotéine et de l'antigène carcino-embryonnaire ont suivi le développement des techniques immunologiques. Actuellement, des techniques telles que les bio-puces, souvent disponibles à partir de plateformes commerciales (par exemple *https://biopuce.insa-toulouse.fr*) ou la protéomique offrent d'intéressantes perspectives.

2.3 Développement et validation des biomarqueurs

La stratégie de développement de biomarqueurs est discutée par plusieurs auteurs (17) (18). Le EDRN (Early Detection Research Network) qui peut se traduire par « Réseau de recherche sur la détection précoce »), du National Cancer Institute Américain, recommande un processus en cinq étapes pour le développement d'un biomarqueur :

- ✓ Une première phase de recherche exploratoire de biomarqueurs potentiels lors d'une étude préclinique impliquant quelques dizaines ou centaines de patients dans un groupe « malade » comparés à un groupe « sain ».
- ✓ La deuxième étape sera une étude statistique sur un nombre important de patients qui déterminera la possibilité d'un test clinique reproductible.
- ✓ Ensuite une étude clinique rétrospective qui doit permettre de valider la capacité du biomarqueur à détecter la maladie avant l'apparition des symptômes.
- ✓ On termine par une étude clinique prospective qui peut durer plusieurs années sur la population ciblée pour confirmer l'utilité du biomarqueur.

2.4 Types de biomarqueurs

2.4.1 Les marqueurs enzymatiques : Définition

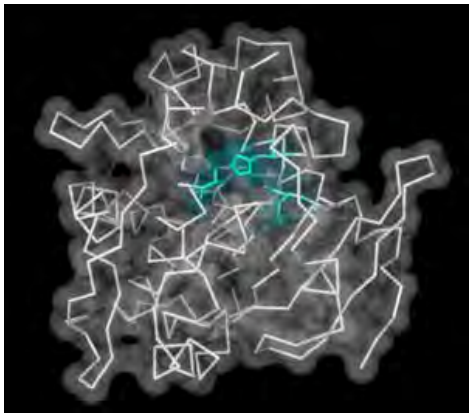


Figure 4 *: « Lingual lipase catalytic triad highlighted center »*

Une enzyme est définie comme une protéine aux propriétés catalytiques. Il s'avère que pratiquement toutes les biomolécules capables de catalyser des réactions chimiques dans les cellules sont des enzymes : une enzyme abaisse l'énergie d'activation d'une réaction chimique et cette dernière devient plus rapide.
Dans une cellule, presque tous les processus métaboliques requièrent des enzymes pour se dérouler suffisamment vite pour maintenir la cellule en vie. Les enzymes catalysent plus de 5000 réactions chimiques différentes. Surveiller l'augmentation ou la baisse des taux d'enzymes peut aider à diagnostiquer un grand nombre de pathologies.

2.4.2 Deux exemples :

- ✓ Le CPK **:** La créatine phosphokinase ou CPK (ou créatine kinase ou CK) est une enzyme importante dans le métabolisme de l'énergie, que l'on trouve dans de nombreux tissus et organes (cerveau, cœur, muscles…). Son dosage dans le sang permet d'envisager une atteinte musculaire, cardiaque ou cérébrale (19) (20). On connait trois types de créatine phosphokinase : CPK-BB dans le cerveau et les poumons, CPK-MB dans le cœur et CPK-MM dans les muscles.
  L'augmentation des taux de CPK-BB peut être provoquée par :
  - Un cancer du cerveau
  - Un traumatisme crânien, accident vasculaire cérébral, hémorragie du cerveau
  - Un infarctus pulmonaire (mort d'un tissu pulmonaire)
  - Une crise d'épilepsie
  - Une thérapie électro-convulsive

On peut remarquer que dans ce cas, comme souvent, les niveaux élevés du biomarqueur ne sont pas caractéristiques d'une seule pathologie.

- ✓ Des enzymes hépatiques **:** Les élévations des enzymes hépatiques (phosphatases alcalines, transaminases,..) peuvent être liées à une inflammation ou à une lésion du foie (21).

En règle générale, cette augmentation n'est pas due à une maladie hépatique grave ou chronique, mais elle est plutôt causée par un ou plusieurs facteurs exogènes tels que :

- les médicaments sur ordonnance et en vente libre (les statines ou le paracétamol)
- l'alcool
- l'accumulation de cuivre dans le corps : la maladie de Wilson
- le cytomégalovirus (CMV) ou le virus Epstein-Barr
- l'excès de fer dans le sang : l'hémochromatose

- ✓ Un grand nombre d'autres pathologies peuvent aussi influées sur ces niveaux, par exemple :

- les maladies inflammatoires (la dermatomyosite, la pancréatite, et l'inflammation de la vésicule biliaire)
- les maladies musculaires (la myopathie ou la polymyosite)
- l'hypothyroïdie
- les maladies cœliaques (pathologie digestive)
- les maladies hépatiques (les hépatites, la stéatose hépatique, le cancer, la cirrhose).

La modulation de leur taux n'est donc pas synonyme d'une seule pathologie, soulevant un des problèmes majeurs dans l'utilisation de biomarqueurs. Il est alors nécessaire d'envisager une approche avec de multiples marqueurs.

2.5 D'autres protéines

2.5.1 Etude du protéome

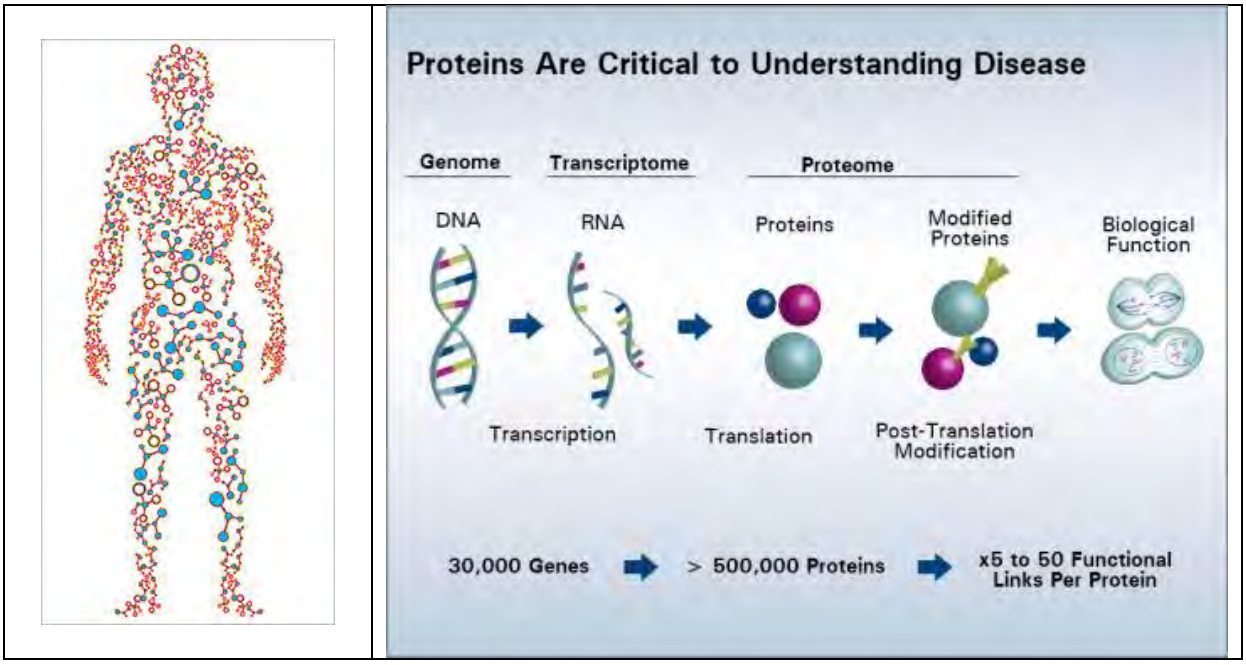


Figure 5 *: Du génome au protéome (par Jean Pierre Lavergne VieS des Sciences, SociétéS, ArtS)*

La protéomique c'est la science du protéome qui étudie l'ensemble des protéines de la cellule, d'organites, de tissus, d'organes ou d'organismes à un instant précis et dans des conditions définies.

Les protéines dans un échantillon biologique tel que la salive peuvent être étudiées individuellement, par exemple avec les analyses par anticorps et ELISA, et ceci avec rapidité et précision. Alternativement, elles peuvent être examinées dans leur ensemble. Dans ce deuxième cas on parle du protéome, et l'on procède alors à une analyse en spectrométrie de masse.
Le décryptage du protéome salivaire a révélé la présence d'au moins 1166 protéines (22) . Ces études sont plus lourdes et plus longues mais beaucoup plus riches en informations.

2.5.2 Etude de quelques protéines

Depuis près de 50 ans, les protéines sont utilisées maintenant comme biomarqueurs dans le cancer (exemples de l'α-fœtoprotéine et de l'antigène carcino-embryonnaire) (23) (24).

On peut s'attendre à ce que le nombre de protéines étudiées comme biomarqueurs explose dans les années à venir. Il n'est nul besoin de connaitre la fonctionnalité d'une protéine pour qu'elle soit considérée comme un biomarqueur utile. Par exemple un peptide de la protéine ZNF 510 dosée dans la salive peut prédire l'OSCC (Oral Squamous Cell Carcinoma) (25). L'important est que son niveau dans le fluide analysé, par exemple la salive soit mesuré avec

précision, et fiabilité enfin que son taux varie de façon significative avec l'état ou l'évolution de la pathologie suivie.

Par exemple, l'évolution de la maladie d'Alzheimer est suivie par les biomarqueurs du Liquide Cérébro-Spinal (LCS). Ce liquide est obtenu après réalisation d'une ponction lombaire. Dans un profil typique, des biomarqueurs du LCS de la maladie d'Alzheimer (MA) sont associés à une diminution de la concentration du peptide $A\beta_{42}$ et une augmentation des protéines Tau et de leurs formes phosphorylées P-Tau.

De nombreuses études montrent l'intérêt de ces biomarqueurs :

- pour le diagnostic positif (maladie d'Alzheimer versus sujets contrôles sains),
- pour le diagnostic différentiel (MA versus autres types de démences, démences fronto-temporales, maladie à corps de Lewy, démences vasculaires)
- pour le diagnostic dès les stades précoces de la maladie (26)

2.6 Des métabolites

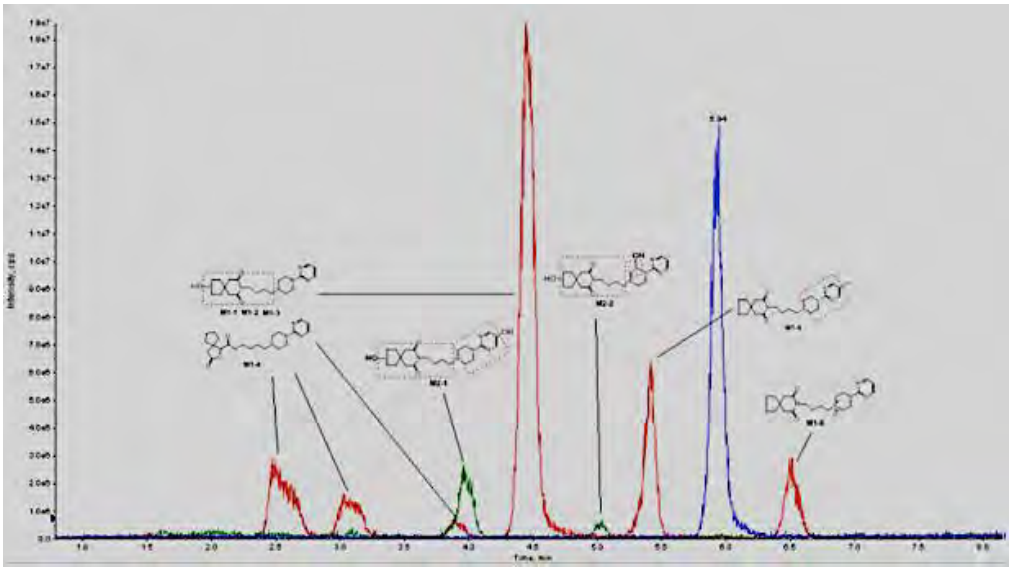


Figure 6 *: Tracé de métabolites*

2.6.1 Définition d'un métabolite

Un métabolite peut être un composé organique intermédiaire ou un produit du métabolisme. Ce terme désigne en général des petites molécules ou monomères, par opposition aux macromolécules. Par exemple le glucose est un métabolite, contrairement au glycogène, qui est un polysaccharide de poids moléculaire très élevé.

On peut distinguer les métabolites primaires des métabolites secondaires.

- ✓ Les métabolites primaires sont directement impliqués dans les processus indispensables à la cellule ou l'organisme. Ce sont par exemple des acides aminés, des alcools, des acides carboxyliques, des nucléotides, des antioxydants, des polyols ou encore des vitamines.
- ✓ Les métabolites secondaires ne participent pas directement aux processus vitaux mais assurent cependant des fonctions importantes. Ce sont par exemple les antibiotiques et les pigments biologiques.

Certains métabolites ont déjà été étudiés dans la salive (27).

2.6.2 Exemple d'étude

Dans une étude de l'Université de Marseille, l'équipe de chercheurs, dirigée par le Dr Amélie Marsot, décrit en détail les profils pharmacocinétiques du THC (Δ9-tétrahydrocannabinol) et de ses métabolites dans la salive, le plasma sanguin et l'urine (28). Cette étude montre les difficultés potentielles à étudier un métabolite comme biomarqueur dans la salive. En effet :

- ✓ 18 fumeurs de tabac et de cannabis, âgés de 20 à 45 ans, ont pris part à cette étude. Chaque participant a reçu soit une cigarette de tabac pour contrôle, soit une cigarette de tabac avec 0,5g de cannabis (20mg de THC). Ces patients ont été prélevés 16 fois pour la salive et le sang et 6 fois pour l'urine.
- ✓ La présence de THC, 11-0H-THC (principal métabolite psychoactif du THC) et de THC-COOH (un métabolite inactif) a été recherchée dans tous ces échantillons. Les analyses ont montré une grande variabilité de résultats. Les concentrations maximum de THC variaient de 55,4 à 120 000 ng/mL dans la salive et de 1,6 à 160 ng/mL dans le plasma.

Les auteurs en ont conclu que le contenu de la salive en THC n'était pas indicatif du contenu du sang en THC ou de ceux des échantillons d'urine. Cela va-t-il dans le sens d'une remise en question du test salivaire ?

2.7 Le microbiome et/ou microbiote

D'après Pascale Cossart, microbiologiste à l'Institut Pasteur, « on parle de "***microbiote***" pour désigner l'ensemble des espèces microbiennes présentes dans un environnement défini, et de "***microbiome***" quand il s'agit de l'ensemble des gènes présents dans ce microbiote (29).

D'après Vincent Blasco-Baque, docteur en science de l'université Paul Sabatier, on parle essentiellement de microbiote, en faisant la distinction entre les différents microbiotes du corps humain (intestinal, buccal…) (30).

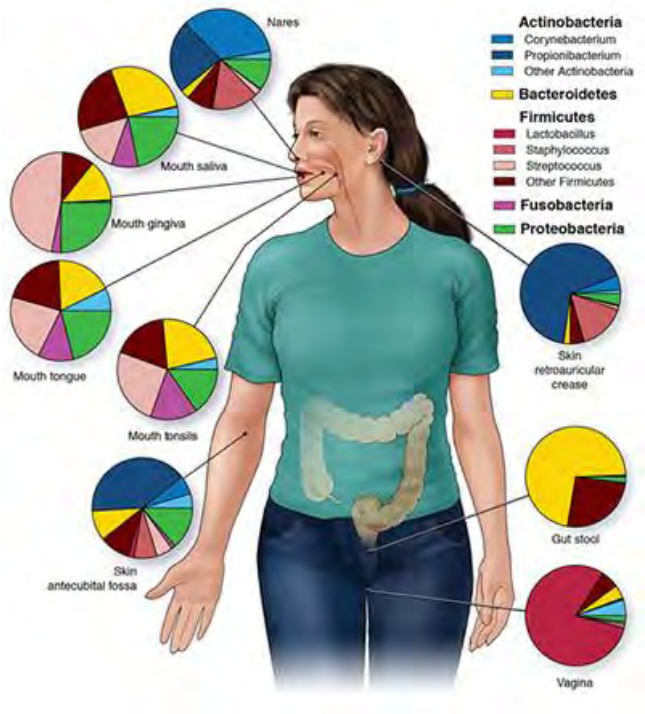


Figure 7 *: Les différents microbiotes du corps humain*

DEFINITION

Le microbiome est l'ensemble des génomes des bactéries présentes dans l'organisme d'un individu (31). Ces bactéries, qui vivent en symbiose avec leur hôte, jouent des rôles divers aussi bien dans la digestion que dans la défense contre les organismes pathogènes, ou même l'équilibre psychique !

Le nombre de bactéries hébergées par le corps humain est dix fois plus élevé que le nombre de ses propres cellules. Les microbiotes peuvent maintenant être brevetés en tant que biomarqueurs, par exemple l'EP 2102350 A2 (Univ. of Washington, St. Louis): *« La présente invention concerne le microbiote intestinal en tant que biomarqueur et cible thérapeutique pour la récupération d'énergie, la perte ou le gain de poids, et/ou l'obésité chez un sujet».*

Les premières analyses des microbiotes à partir de la salive ont été publiées récemment (32).

L'équilibre entre « bonnes » et « mauvaises » bactéries est critique. La bouche est constituée de plusieurs habitats dont les occupants sont différents: la salive, les dents, la langue, le palais, les gencives. On étudie de plus en plus le rôle d'autres types de micro-organismes, tels que les champignons microscopiques et les levures. Il existe des effets bénéfiques de certains micro-organismes présents dans la bouche.

De plus l'introduction d'appareillages liés aux soins dentaires (prothèses, résines, etc.) modifie les relations entre les différentes espèces présentes dans les niches concernées.

Récemment une « *nouvelle forme de vie* » y a été découverte par hasard lors d'un screening de l'ADN et d'ARN (par analyse métagénomique de la microflore buccale). Il s'agirait d'une bactérie parasite, habituellement présente dans les sols, du nom d'*Actinomyces odontolyticus* que l'on retrouve fréquemment dans la cavité buccale.

Cette bactérie est pathogène pour l'hôte, elle est liée à certaines pathologies de type gingivites et fibrose kystique. Les dosages de l'ADN de cette bactérie se révèlent beaucoup plus élevés chez les patients victimes de ces maladies buccales. Sa présence serait due aux mécanismes de résistances aux antimicrobiens présents dans la salive (33).

2.8 Les micro-ARN circulants

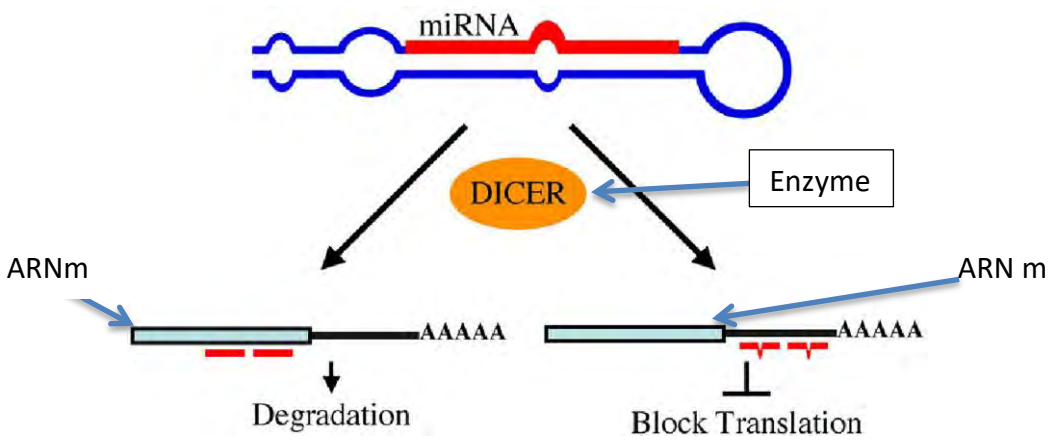


Figure 8 *: Schéma de la fonction d'un miRNA*

Depuis longtemps, l'existence dans la circulation d'acides nucléiques libres a été décrite et imaginée comme outil de diagnostic. Depuis la découverte des microARN (miARN) chez l'homme en 2000 et leur détection dans la circulation en 2008, la caractérisation des miARN circulants est en plein essor. De nombreuses études récentes suggèrent un fort potentiel prédictif à ces molécules qui pourraient bien constituer une nouvelle catégorie de biomarqueurs très utile en clinique (34).

2.8.1 Définition d'un miRNA

Les découvertes issues du séquençage du génome humain ont permis de constater que seulement 1 à 2% de sa séquence codent pour des protéines. Le reste du génome était, il y a peu, encore considéré comme dépourvu de fonction. Il s'avère finalement que près de 90 % de cet ADN est aussi transcrit.

Les ARN non codants (ARNnc) qui en résultent sont impliqués dans des mécanismes visant à réguler l'expression des gènes. Le mode d'action d'un sous-type d'ARNnc, appelés microARN (miARN), a été l'un des premiers mis au jour.

Ces petits ARN intracellulaires longs de 22 nucléotides sont capables de bloquer l'expression de gènes par des mécanismes de régulations post-transcriptionnelles, en se fixant de manière ciblée aux parties 3'non traduites (3'UTR) des ARNm et en provoquant un blocage de la traduction ou la dégradation de ceux-ci. (Voir figure 8)

2.8.2 Fonctions des miARN

La présence de miARN dans le milieu extracellulaire a été mise en évidence en 2008 par Gilad (35). On sait à présent que les cellules sont capables de sécréter ces miARN. Cette sécrétion est complexe et finement régulée.

Les miARN sont envisagés comme biomarqueurs dans de nombreuses pathologies tumorales. Par exemple, dans le cas des cancers du sein, le niveau de miR-195 dans le sang semble corrélé à la taille de la tumeur et retourne même à un niveau basal deux semaines après l'ablation de la tumeur, indiquant le potentiel important de ce miR-195 pour le suivi des patientes (34).

Les techniques de reconnaissance de ces microARN sont bien maitrisées dans les fluides corporels classiques mais quel pourrait être le potentiel de ces microARN comme biomarqueurs dans la salive ? (35)

3 METHODES DE DETECTION DES BIOMARQUEURS

3.1 Analyses enzymatiques

Les enzymes représentent la première catégorie de biomarqueurs étudiée (36) (37).

Une activité enzymatique est mesurée par la transformation d'un substrat qui donne un produit, directement ou par une réaction couplée à une émission de lumière ou de fluorescence. Ce produit est facilement quantifiable en temps réel.

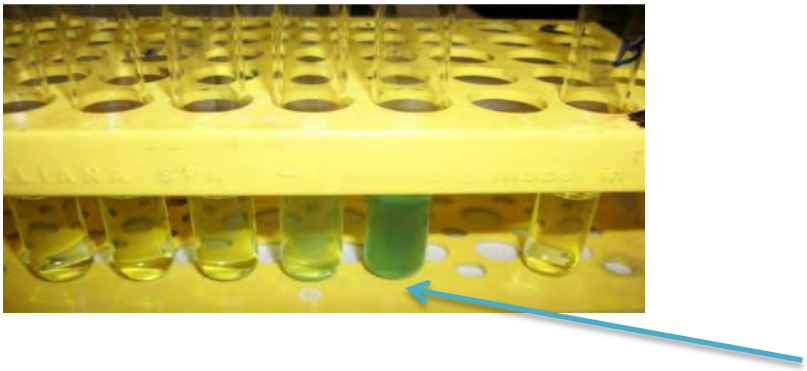


Figure 9 *: Coloration d'une activité enzymatique*

Cette activité enzymatique peut être visible à l'œil nu comme le montre la photo ci-dessus.

Ces analyses enzymatiques sont rapides, faciles et d'un coût modeste, accessibles à beaucoup de laboratoires. Une analyse enzymatique est limitée cependant à un seul marqueur.

3.2 Analyses protéomique

Les premières analyses du protéome d'une cellule ou d'un liquide biologique ont été effectuées sur des gels de polyacrylamides dits « bidimensionnels ». Dans ces analyses, les protéines de l'échantillon sont tout d'abord séparées selon leur point isoélectrique puis de nouveau séparées selon leur poids moléculaire. Cette technique a été introduite par Patrick O' Farrell en 1975, et son article a été cité plus de 20000 fois ! (38).
Ce genre d'analyses qui, comme les analyses enzymatiques, ne nécessite pas d'appareillage lourd, a été supplanté depuis quelques années par une analyse en spectrométrie de masse.

Figure 10 *: Spectromètre de masse*

Contrairement aux analyses sur gels bidimensionnels ou enzymatique les analyses par spectrométrie de masse nécessite un matériel hyper sophistiqué et très onéreux ainsi qu'une grande expertise technique et théorique.

Les différentes molécules d'un échantillon sont détectées par la mesure de leur masse et il est possible ainsi de caractériser leur structure chimique. Le principe de la spectrométrie de masse réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il est ainsi possible de séparer, identifier et quantifier des milliers de protéines différentes dans un échantillon biologique (39) (40).

3.3 Analyses des métabolites

L'analyse de métabolites s'effectue aussi par des techniques de spectrométrie de masse adaptées pour les plus petit poids moléculaire de ces molécules (41).

Si l'on veut étudier l'ensemble du « métabolome » il faut, bien sûr, un laboratoire bien équipé. Par contre pour certains métabolites fréquemment étudiés, il existe des petits appareils, des kits d'analyses, facilement manipulable.

Figure 11 *: Kits d'analyses*

Comme pour toutes ces méthodes de dosage, le fluide de prélèvement utilisé est critique. Selon différentes études, l'analyse d'urine ou de salive peut être, ou pas, aussi fiable que la prise de sang (41) (42). L'avenir des biomarqueurs métaboliques reste grand ouvert (43).

3.4 Analyses par PCR

La réaction de polymérisation en chaine (Polymerase Chain Reaction ou PCR) a été inventée en 1983 par Kary Mullis (44) un chercheur de Cetus Corporation en Californie.

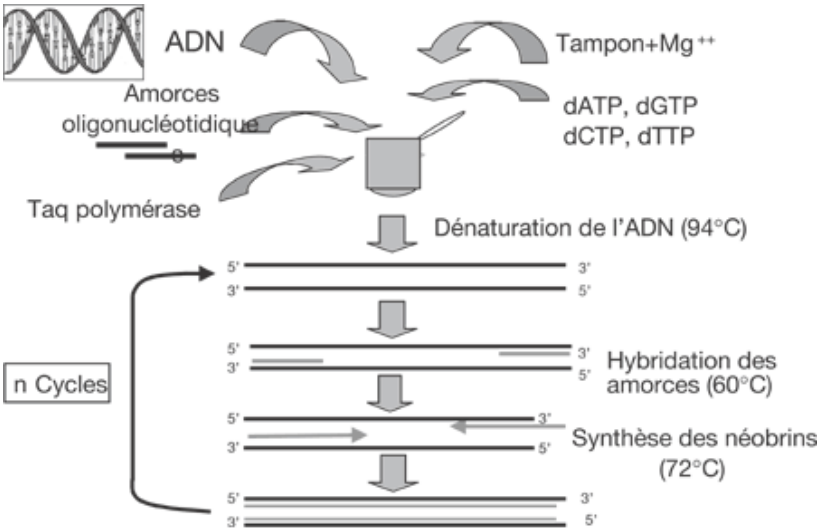


Figure 12 *: Schéma de l'amplification d'un brin d'ADN*

Figure 13 *: Appareil de PCR*

Le principe décrit par Mullis consiste à amplifier successivement sur plusieurs cycles un deuxième brin d'ADN à partir de deux brins séparés d'ADN, contenant la séquence d'intérêt, afin de produire une quantité très importante de copies de cette séquence d'origine. Cette technique (45) permet soit :

- ✓ la détection d'un allèle pour un gène d'intérêt
- ✓ la quantification du niveau d'un ARN messager ou d'un miARN dans les différents échantillons.

3.5 Analyses du microbiome

Inconnu il y a 10 ans, le microbiome prend aujourd'hui sa place comme organe à part entière dans le corps humain, ceci par l'avancée des techniques de séquençage massive. Le séquençage des génomes des microbes (microbiome) présents dans un organe humain permet d'identifier ces micro-organismes (46) et (47).

Figure 14 *: Startups spécialisées dans la connaissance du microbiome*

Une base de données répertoriant le microbiote oral a été ouverte début 2008 par l'Institut Américain de Recherche Dentaire et Crâniofaciale (NIDCR). Grâce au séquençage de l'ARNr 16S, les chercheurs pourront peu à peu classer les micro-organismes dans un arbre généalogique et mieux comprendre leur importance, par exemple pour l'expression des caries dentaires ou des divers troubles de la digestion.

3.6 Analyses des biomarqueurs dans la salive

3.6.1 Conditions de prélèvement de la salive stimulée ou non-stimulée

Le prélèvement de salive pour effectuer des dosages de biomarqueurs est de plus en plus répandu pour de nombreuses pathologies (48). Par exemple, en 2014 l'équipe du professeur Joe Herbert de l'Université de Cambridge a montré qu'un dosage salivaire du cortisol chez les garçons adolescents pourrait prédire un risque de dépression à l'âge adulte (49).

Il existe deux conditions au prélèvement de la salive : stimulée et non-stimulée. La stimulation de la production de salive par le fait de mâcher (par exemple du chewing gum ou un bloc de paraffine) augmente la production de salive d'un facteur dix. Il faut noter que cette stimulation n'est pas anodine car la composition de la salive change dans ces conditions (voir Figure 15). La figure ci-dessous décrit les variations de pH avant, pendant et après la mastication d'un *chewing gum*. Ces changements sont dus à l'augmentation de la concentration du bicarbonate dans la salive.

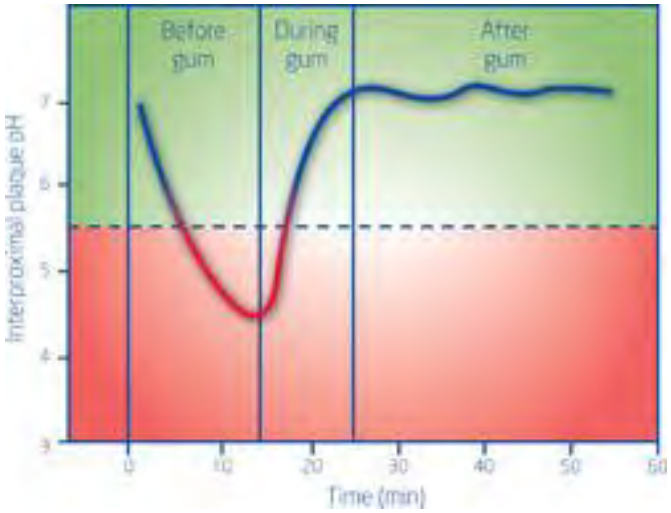


Figure 15 *: Variation de pH avant et après la mastication d'un "gum"*

Le patient peut lui-même effectuer ses prélèvements salivaires, mais les paramètres de prélèvement doivent être déterminés en fonction de l'analyse à réaliser. Il faudra prendre en considération les volumes recueillis ainsi que les questions de stérilité et de contamination éventuelle avec d'autres tissus de l'hôte (notamment la contamination par du sang). Ces prélèvements sont généralement stables à température ambiante.

Plusieurs facteurs peuvent influencer le volume du flux salivaire :

- ✓ des problèmes de salivation associés à la prise de certains médicaments
- ✓ le stress et les syndromes anxio-dépressifs,
- ✓ la radiothérapie cervico-faciale (qui détruit les glandes salivaires principales),
- ✓ la maladie de Gougerot-Sjögren ou syndrome sec qui est une maladie systémique auto-immune avec atteinte des glandes salivaires principales.
- ✓ d'autres maladies auto-immunes comme la sarcoïdose, l'amylose, le diabète ou le SIDA peuvent également être à l'origine d'une hyposialie.

3.6.2 La préparation de l'échantillon

Le protocole de préparation d'un échantillon pour le dosage de biomarqueurs (50) doit être:

- ✓ reproductible
- ✓ d'une sensibilité maximale
- ✓ simple d'utilisation, le moins de manipulations possible réduisant la variabilité du prélèvement, surtout si celui-ci est réalisé par le patient et non par du personnel qualifié.

Pour ces différentes raisons, la salive assure ces critères puisque le prélèvement et le stockage sont très faciles et que le patient peut lui-même effectuer ses prélèvements.

Toutefois certaines précautions sont parfois conseillées:

- ✓ Ne pas avoir mangé ou bu dans les 30 minutes qui précèdent le recueil de la salive.
- ✓ Il est recommandé de se rincer la cavité buccale avec de l'eau juste avant la collecte salivaire.
- ✓ Oter toute trace de produits sur les lèvres (baume, rouge..) si nécessaire
- ✓ Tout échantillon suspect ou coloré (par du sang…) est refusé, une contamination entrainant des résultats d'analyses erronés.

3.6.3 Le choix des populations à étudier et l'analyse des résultats

Lors du développement d'une étude clinique sur des biomarqueurs, susceptibles d'être liés à une pathologie, les conditions de réalisation de l'étude doivent être clairement établies. Un cahier des charges aux multiples considérations est rédigé (51).

3.6.3.1 Choix des cohortes

Parmi les multiples considérations, on relèvera :

- ✓ le nombre de cohortes différentes,
- ✓ la taille de la population dans chacune de ces cohortes,
- ✓ leur composition (hétérogénéité ou homogénéité par rapport à l'âge, au sexe, au poids, à l'ethnie, à l'activité…).

Dans le choix des populations à étudier et participant à l'étude, il peut être judicieux de choisir trois types de populations:

- ✓ des individus supposés normaux,
- ✓ des individus porteurs de la pathologie à évaluer
- ✓ et un troisième type d'individus correspondant à une deuxième maladie (ou famille de pathologies) reliée.

De ce fait, il sera possible de déterminer, par exemple, si la baisse de lactoferrine constatée dans la maladie d'Alzheimer (AD) est une caractéristique propre à cette maladie ou plutôt un signe général d'une maladie neurodégénérative.

3.6.3.2 Evaluation des résultats

Ces résultats seront confortés et validés par des tests statistiques adaptés qui permettront de dire si oui ou non les différences constatées sont significatives ou s'ils auraient pu être obtenus par le seul fait du hasard.
L'évaluation de ces valeurs expérimentales sera réalisée par une mesure statistique en déterminant la valeur de « p » (comprise entre 0 et 1) qui signifie valeur de probabilité. Plus cette valeur « p » est proche de zéro, moins il y a de probabilité que la différence constatée entre les différents sujets de la cohorte ait été obtenue par hasard.

3.6.4 La corrélation de l'augmentation (ou la diminution) du biomarqueur, ou des biomarqueurs, et l'apparition de la maladie

Etablir un test prédictif c'est notre but ! Pour se faire il faut pouvoir identifier les marqueurs qui apparaissent avant ou avec les premiers signes de la maladie. Ceci suppose d'avoir d'autres moyens d'identifier les individus en phases précoces de la maladie, ou de pouvoir faire une étude prospective d'une population dont un certain nombre d'individus seront identifiés par la suite comme malades.
Par exemple, le dosage du L-leucine semble être prometteur pour le diagnostic chez les personnes susceptibles d'avoir un Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) précoce (52).
Dans cette étude de Wang et al, (52) les auteurs notent que la sensibilité et la fiabilité des résultats sont augmentées par l'analyse en parallèle d'un deuxième marqueur, la L-phénylalanine.
Ceci est un constat général : plus on étudie de marqueurs, plus les résultats obtenu seront fiables et précis dans la détermination du diagnostic et de la pathologie à traiter ou à prévenir.
C'est pourquoi les techniques qui étudient simultanément de multiples biomarqueurs (protéomique, PCR quantitative, métabolomique,…) suscitent un intérêt croissant dans les domaines de la prévention et du diagnostic.

3.7 Biomarqueurs et pathologies

3.7.1 Biomarqueurs et pathologies parodontales

Blasco-Baqué, V. en 2013 décrit « les maladies parodontales comme des infections bactériennes associées à une inflammation des tissus de soutien de la dent » (53).

Il existe deux stades dans ces maladies parodontales :

- ✓ le premier stade avec une atteinte de la gencive marginale (voir partie gauche de l'image) avant d'atteindre
- ✓ dans un deuxième stade l'ensemble du parodonte profond (os, ligament et cément) appelé Parodontite (voir partie droite de l'image) (53).

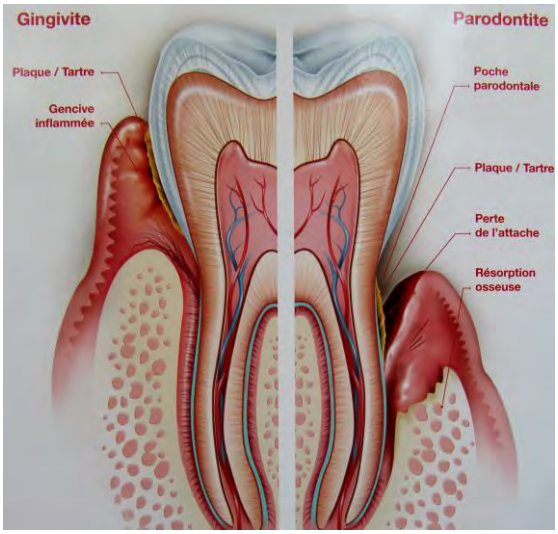


Figure 16 *: Différents stades d'une maladie parodontale*

Ces processus sont initiés par des bactéries, cependant la raison principale de cette dégradation est une réponse immunitaire qui n'est pas suffisamment contrôlée. Ceci subvient souvent sans symptôme marqué et, par conséquent, les malades demandent de l'aide à un stade relativement avancé. Il en résulte souvent une perte conséquente de dents comme l'on décrit Petersen et Ogawa (54) qui ont estimé que 10-15% des populations adultes souffrent de maladies parodontales avancées. L'impact économique des pathologies dentaires dans le monde était de 442 billion US$ en 2010 (55) et de 144 billion US$ en coûts indirects, d'où l'intérêt médical et financier d'un diagnostic précoce et efficace de ces pathologies.

L'analyse de la salive pour un diagnostic parodontal est de plus en plus utilisée (56), de nombreuses données sont maintenant disponibles.

L'existence de périodes d'exacerbation et de rémission, la coexistence d'autres maladies systémiques telles que le diabète, et la présence de facteurs d'aggravation comme le tabac, l'alcool, les drogues… compliquent les analyses de biomarqueurs dans ces pathologies.
Pour faire face à ces perturbations dans les diagnostics, une détection simultanée de biomarqueurs bactériens et de biomarqueurs venant de l'hôte a été proposée (57) (58).

De nombreuses propositions pour l'utilisation de biomarqueurs dans le diagnostic des maladies parodontales sont publiées, en voici quelques-unes.

- ✓ Des protéines reliées aux inflammasomes NLRP3 (59).
- ✓ Des métabolites liés au métabolisme des polyamines, de l'arginine, du proline et de la lysine (60).
- ✓ Des métabolites, des bactéries tel *P. gingivalis, T. forsythia* ou *T. denticola* dans la salive par spectrométrie de masse (61).
- ✓ Des microRNAs (miR-142-3p, miR-146a, miR-155, miR-203, and miR-223) qui pourraient être des marqueurs, bien que non spécifiques, des maladies parodontales (62).
- ✓ Un biocapteur colorimétrique pour mesurer l'élastase (HNE) et la cathepsine-G (63).
- ✓ Enfin, les effets croisés entre la Parodontite Chronique et d'autres pathologies de la bouche tel l'Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) peuvent être démontrés par des analyses de biomarqueurs mRNA salivaires (interleukines IL-8, IL-1β, dual specificity phosphatase 1…) (64).

3.7.2 Biomarqueurs de salive et cancers de la bouche

Une personne meurt d'un cancer de la bouche toutes les heures.

Les cancers de la bouche (cavité oral, lèvre, pharynx…) représentent le sixième type de tumeur en termes de prévalence dans le monde (65). 90% sont des carcinomes OSCC (oral squamous cell carcinomas). La mortalité due aux OSCC est plus élevée que dans tous les autres carcinomes. Bien que la cavité orale soit facilement accessible, la plupart de ces cancers sont détectées à un stade relativement avancé, ce qui explique en partie le faible taux de survie.

3.7.2.1 Etudes protéomiques

Le développement des biomarqueurs dans la salive (ADN, ARN, protéines, métabolites,..) a été particulièrement axé sur ces pathologies et de nombreuses autres pistes sont en cours d'exploration. Les recherches actuelles visent aussi bien le diagnostic précoce de ces maladies que la définition des sous-types d'une pathologie qui peut présenter une hétérogénéité importante.

Chaque étude semble porter son lot de nouveaux marqueurs :

- ✓ Par exemple, à partir d'études de protéomique, Yu et al (65) proposent quatre marqueurs salivaires (MMP1, KNG1, ANXA2, and HSPA5).
- ✓ Dans une étude semblable, Kawahara R et al (66) détectent quatre autres protéines (CFB, C3, C4B, SERPINA1 and LRG1) qui pourraient être des marqueurs salivaires pour l'OSCC.

3.7.2.2 Etudes sur l'expression génétique

De plus en plus de recherches portent sur la détection des marqueurs liés à la régulation de l'expression génétique, plutôt qu'à l'expression des protéines elles-mêmes
Les micro ARN (miARN) sont un champ fertile pour l'identification des marqueurs spécifiques d'un tissu, d'un organe, d'un état physiologique ou pathologique. Momen-Heravi F et al (67) ont recherché l'expression de miARN salivaires spécifiques des cancers de la bouche. Ils en détectent 13, dont 11 étaient sous exprimés (miRNA-136, miRNA-147, miRNA-1250, miRNA-148a, miRNA-632, miRNA-646, miRNA668, miRNA-877, miRNA-503, miRNA-220a, miRNA-323-5p) et deux surexprimés (miRNA-24, miRNA-27b). De telles analyses salivaires sont facilement généralisables à d'autres pathologies, où les mutations dans les gènes sensibles peuvent être suivies avec des capteurs électrochimiques (68).

3.7.2.3 Choix des cohortes

Les études de Csősz É et al (69) sur une population d'Europe de l'Est rappellent, s'il en est besoin, l'importance du choix de la cohorte, de la population et de son ethnie.
Il s'avère délicat d'extrapoler des résultats d'analyses faites sur la salive des français de race blanche et d'en tirer des conclusions sur les résultats obtenus avec la salive des hongrois….

3.7.3 Biomarqueurs de salive et diabètes

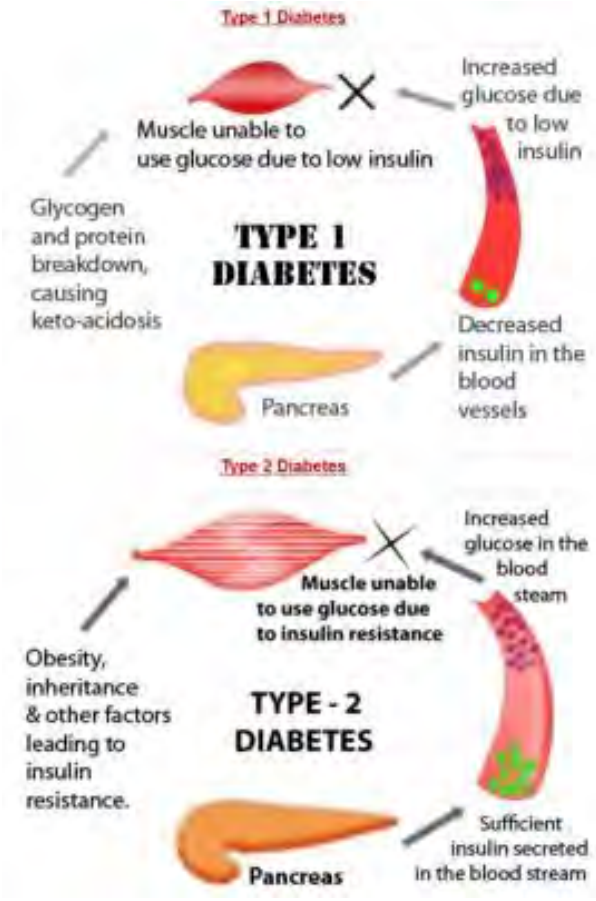


Figure 17 *: La différence entre les deux diabètes*

Le diabète est un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. Cela se traduit par une glycémie élevé : l'hyperglycémie.
Une glycémie à jeun fait suspecter un diabète si elle se situe au-delà de 7mmol/l (1,26g/l). Elle doit être reprise une seconde fois pour confirmation (53).

3.7.3.1 Différents types de diabète

On distingue principalement deux types de diabète : le diabète de type 1 qui touche environ 6% des diabétiques et le diabète de type 2 qui en touche 92 %.
Les autres types de diabète ne concernent que les 2 % restants (diabètes secondaires à certaines maladies ou prises de médicaments).

- ✓ Le diabète de type 1, appelé autrefois diabète insulinodépendant (DID), est habituellement découvert chez les personnes jeunes : enfants, adolescents ou jeunes adultes. Ce diabète résulte de la disparition des cellules β du pancréas entraînant une carence totale en insuline. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune, soignée par un apport d'insuline.
- ✓ Le diabète de type 2 apparaît généralement chez les personnes âgées de plus de 40 ans, bien que des premiers cas d'adolescents et d'adultes jeunes touchés

apparaissent en France. Dans le diabète de type 2, autrefois appelé non insulinodépendant (DNID), le processus est différent de celui du diabète de type 1. Deux anomalies sont responsables de cette hyperglycémie :

- soit le pancréas fabrique toujours de l'insuline mais pas assez, par rapport à la glycémie, c'est l'insulinopénie : défaut de sécrétion.
- soit cette insuline agit mal, on parle alors d'insulinorésistance : défaut d'action de l'insuline (53).

3.7.3.2 Dosages de la glycémie

Les dosages du glucose dans le flux salivaire se révèlent très prometteurs pour plusieurs raisons.

- ✓ La rapidité du test, réalisation en temps réel, est permise par des biocapteurs (70) et (71).
- ✓ La facilité du prélèvement salivaire constitue une révolution pour tous les patients, (72) (73) (74).

Une étude bibliographique récente montre que l'usage du flux salivaire pour le dosage du glucose dans le dépistage d'un diabète devient possible. Des études de validation de ces essais cliniques sont actuellement en cours (75).

Plusieurs équipes ont cherché et cherchent à identifier d'autres biomarqueurs pour le diagnostic d'un diabète précoce.

- ✓ Pour Rao PV et al. 65 marqueurs varient de plus du double chez les diabétiques de type 2 par rapport aux sujets normaux (76).
- ✓ Barnes VM et al réalise une étude croisée avec des patients sains et des sujets diabétiques présentant ou pas de maladies parodontales (77).
- ✓ La glycosylation des protéines de la salive pourraient aussi servir comme témoin de la glycémie (78).
- ✓ Chung TJ et al montre l'association entre les taux de l'α-2 macroglobuline et les caractéristiques cliniques d'un diabète de type 2 (79).
- ✓ Dans l'étude réalisée par Yu-Hsiang Lee et al, quatre biomarqueurs (*KRAS*, *SAT1*, *EGFR*, and *PSMB2*) pourraient servir à distinguer des malades T2DM des sujets sains (80).
- ✓ Même un paramètre aussi simple que la mesure du pH de la salive pourrait être un indicateur de l'incidence du diabète (81).

3.7.3.3 Validation des techniques

Un effort considérable a été investi pour et dans le développement des biocapteurs capables de détecter le glucose dans la salive plutôt que dans le sang. La démonstration de la fiabilité et donc la validation de toutes ces méthodes pour le diagnostic des diabètes est en cours dans de nombreuses équipes de recherches (70).

4 LES BIOCAPTEURS

4.1 Définition

Un biocapteur est un dispositif analytique qui convertit une réponse biologique en signal électrique (82) (83).

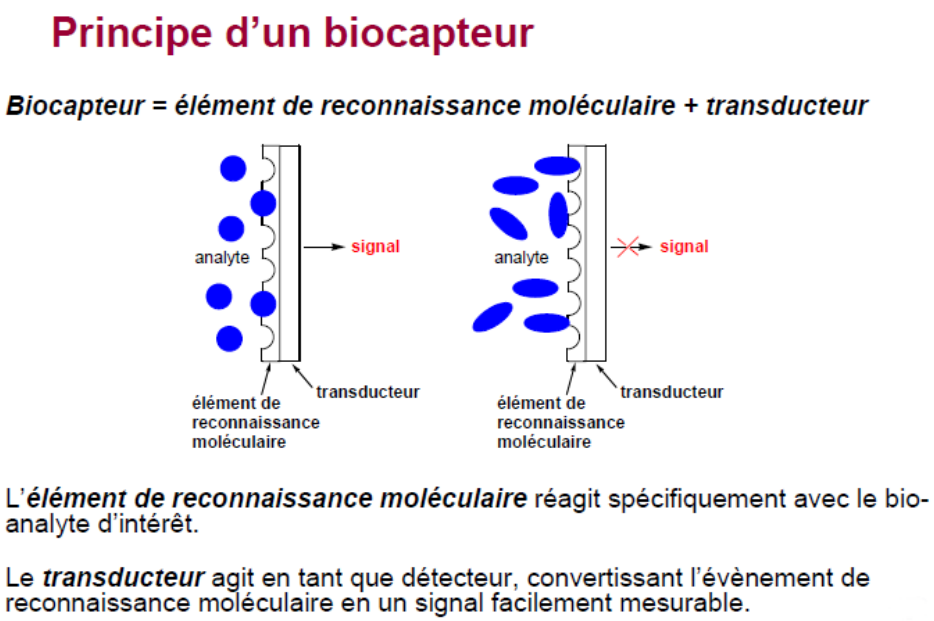


Figure 18 *: Principe d'un biocapteur*

En général l'utilisation du terme **biocapteur** implique l'utilisation d'un système biologique au départ, bien que certains journaux (par ex le journal Biosensors) parlent aussi de « biocapteurs » quand ce critère n'est pas rempli. Le système biologique en question est le plus souvent une réaction enzymatique, mais des métabolismes cellulaires complexes, les liaisons de ligand et les réactions antigène-anticorps sont aussi de plus en plus employées (84) (85).

4.2 Les différents types de Biocapteurs

Le champ des biocapteurs est en plein essor avec une progression annuelle d'environ 60%. Les moteurs principaux de cette croissance sont les industriels de la santé.

- ✓ par exemple 6% des habitants des pays développés sont diabétiques et demandeurs d'un capteur rapide et simple pour le dosage du glucose.

Les autres domaines d'expansion pour l'utilisation des biocapteurs sont :

- ✓ l'analyse et le contrôle des aliments
- ✓ le monitoring des paramètres environnementaux

L'estimation du marché pour tous les biocapteurs est de $12 000 000 000 par an, dont 30% serait consacré au domaine de la santé. Pour l'instant, seul 0.1% de ce marché utilise des biocapteurs.
Une grande part de la recherche en développement actuelle concerne les biocapteurs potentiométriques et ampérométriques, ou alors des colorations enzymatiques.

4.2.1 Choix d'un biocapteur

Pour qu'un biocapteur soit sélectionné, il doit posséder au moins les caractéristiques suivantes (85):

- ✓ Etre très spécifique
- ✓ Avoir une réponse précise, linéaire et indépendante des paramètres physiques (tel le pH)
- ✓ Etre très stable
- ✓ Etre stérile pour l'utilisation en clinique
- ✓ Etre peu couteux, petit et portable
- ✓ Etre d'une utilisation facile par des opérateurs non-professionnels
- ✓ Avoir un marché prospectif bien défini

4.2.2 Fonctionnements

Enzymes, anticorps, ADN, cellules entières, microorganismes peuvent être l'élément de reconnaissance moléculaire immobilisé à la surface du transducteur par physisorption, chimisorption ou par piégeage dans une membrane inerte (86). Cet élément de reconnaissance offre une spécificité et une sensibilité élevées pour l'analyte et donne une réponse rapide.

La détection des changements physiques de l'élément de reconnaissance est réalisée par le transducteur. Ce composant du biocapteur convertit le substrat en un produit détectable et quantifiable. Après amplification celui-ci est affiché et sauvegardé, par exemple le glycomètre.
La réponse biologique d'un biocapteur est donc dictée par le substrat fixé sur cette membrane biocatalytique.
Par exemple, les enzymes immobilisés sur ce type de membrane possèdent plusieurs propriétés intéressantes pour la fonction de biocapteur (86).

- ✓ Ces enzymes peuvent être réutilisés, ce qui garantit les résultats plus reproductibles et qui rend le procédé moins coûteux.
- ✓ Ils montrent une linéarité de plusieurs logs dans la concentration de substrat, correspondant à des gammes de concentrations trouvées réellement dans des fluides biologiques.
- ✓ L'accessibilité de l'analyte peut être réglée par l'utilisation d'une membrane semi-poreuse entre l'enzyme et la solution à examiner.

Les recherches évoluent très rapidement, on parle des trois générations de biocapteurs.

- ✓ Dans la première, le produit de la réaction diffuse au transducteur pour provoquer une réponse électrique. Le signal électrique du transducteur est souvent très bas. Il est superposé au « bruit de fond », et ce rapport signal - bruit de fond doit être optimisé pour que le biocapteur soit opérationnel.
- ✓ Dans le deuxième, des médiateurs spécifiques passent entre la réaction et le transducteur pour générer une réponse accrue.
- ✓ Dans le troisième, c'est la réaction elle-même qui génère la réponse et il n'y a pas de diffusion de produit ou de médiateur.

La figure ci-dessous de Martin Chaplin illustre le fonctionnement d'un biocapteur et ses composants majeurs (87).

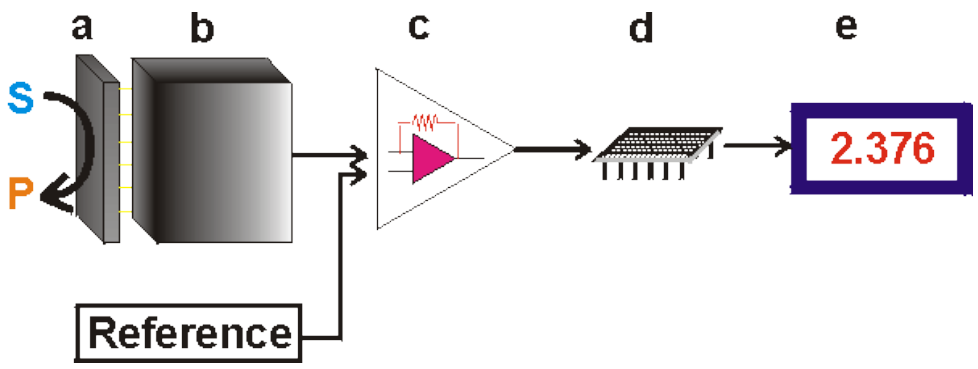


Figure 19 *: Fonctionnement d'un biocapteur*

Le biocatalyste (a) convertit le substrat S en produit P. La vitesse de cette réaction est analysée par le transducteur (b) qui le convertit en signale électrique. La sortie du transducteur est amplifiée (c) traitée (d) et affichée (e).

4.2.3 Différents types de Biocapteurs

Le transducteur exploite le changement physique qui accompagne la réaction. Ces réactions peuvent être exprimées sous différentes formes qui donneront sa spécificité au biocapteur (85).

- ✓ La chaleur émise ou absorbée par la réaction : biocapteur **calorimétrique.**
- ✓ Le changement dans la distribution de charges qui donne lieu à un potentiel électrique : biocapteur **potentiométrique.**
- ✓ Le mouvement d'électrons dans une réaction d'oxydo-réduction : biocapteur **ampérométrique.**
- ✓ L'émission ou l'absorbance de lumière : biocapteur **optique.**
- ✓ Les effets des masses des réactifs ou des produits : biocapteur **piezo-électrique.**
- ✓ Les nanobiocapteurs dont les éléments sensibles sont des récepteurs olfactifs : **biocapteur olfactif** (88).

4.2.4 Autres utilisations des biocapteurs

Les cytokines interviennent dans de nombreuses réactions immunitaires et inflammatoires, en agissant sur d'autres cellules immunitaires pour en réguler l'activité. L'utilisation de biocapteurs est déjà en cours d'investigation pour le dosage des cytokines dans les réactions inflammatoires et immunitaires.

- ✓ L'utilisation d'IL6 et d'IL8 comme biomarqueurs a été proposé dès 2004 par St John MA et al pour le diagnostic de l'OSCC (89).
- ✓ En 2015, Zhang Y et al proposent un biocapteur à base de silice pour détecter des changements dans ces cytokines (90). Il semble peu probable que ces molécules soient spécifiques de l'OSCC mais leur dosage pourraient conforter des résultats obtenus avec d'autres marqueurs. Le diagnostic est d'autant plus sûr que les différents résultats obtenus sont concordants. Le traitement médical associé n'en est que plus adapté.

4.3 Biocapteurs du glucose et diabète : Exemples d'objets connectés

Le dépistage précoce d'un diabète pour les sujets à risques est de nos jours très répandu dans les pays évolués. Les industriels de la santé essayent par tous les moyens aujourd'hui disponibles d'initier ces contrôles (91) (92) (93).

4.3.1 Une montre : La K'Watch

La société parisienne PKparis vient de commercialiser l K'Watch Glucose, son bracelet connecté analyse le taux de glycémie sans prélèvement de sang.

Figure 20 *: La K'Watch (1)*

Cette K'Watch, présentée au dernier Congrès de Technologie (CES) de Las Vegas, la technologie SkinTaste® (qui est intégrée dans une gamme de biocapteurs) permet de tester la composition chimique de la peau et de faire des analyses de glycémie sans prélèvement douloureux. Elle fonctionne grâce à des micro-aiguilles d'à peine 0.5mm de long, et qui au contact de la peau examinent le liquide interstitiel, un fluide qui enveloppe les tissus cellulaires. La K'Watch Glucose se connecte alors à une application mobile dédiée qui recense tous les résultats obtenus.

4.3.2 Un tatouage qui change de couleur

Figure 21 *: Tatouage reflétant sa glycémie*

Katia Vega et des chercheurs du MIT (Massachusetts Institute of Technology) ainsi que de la Harvard Medical School ont récemment mis au point une encre de tatouage capable de changer de couleur selon les variations du taux de glucose dans l'organisme.
Encore au stade de recherche, cette encre se nomme « DermalAbyss ». L'invention a déjà livré des résultats prometteurs sur des échantillons de peau de porc. Le changement de coloris est généré par des biocapteurs intégrés dans l'encre. Lorsqu'ils détectent l'augmentation de la concentration de glucose dans le sang, la couleur passe du bleu au brun et indique donc au porteur qu'une injection d'insuline est nécessaire, (Projet DermalAbyss).

4.3.3 Les lentilles dotées de biocapteurs

Le professeur Gregory Herman qui dirige l'équipe de recherche sur le diabète à l'Oregon State University, a choisi de développer des lentilles jetables.

Figure 22 *: Illustration d'une lentille jetable*

Ces lentilles de contact sont dotées d'un biocapteur constitué d'une feuille transparente de semi-conducteur ainsi que d'une enzyme appelée glucose oxydase.
Cette recherche est également poursuivie par d'autres équipes (94).

4.3.4 Des lectures multiples et connectées….

Figure 23 *: Capteur glycémique relié à un smartphone*

Plusieurs lecteurs de dosage de glucose sont déjà commercialisés. Ils permettent de doser à la fois le glucose et d'autres paramètres d'importance pour le malade, comme le cholestérol. En effet, toutes les grandes sociétés pharmaceutiques ont compris l'intérêt de l'e-santé et se sont mis à collaborer avec des sociétés émergentes du Web dans ce domaine, à l'instar de Sanofi qui commence à collaborer avec Google, prévoyant de lancer leur plateforme de médecine personnalisée en 2018.

L'avenir de la médecine personnalisé est bien réel, on parle de **médecine 4 P** : Prédictive, Préventive, Personnalisée et Participative.

Cette évolution futuriste de la médecine repose sur les progrès déjà réalisés en matière de génétique, de pharmacologie, de nanotechnologie et d'informatique. Chaque patient serait traité de façon individualisée en fonction de ses spécificités génétiques et environnementales.

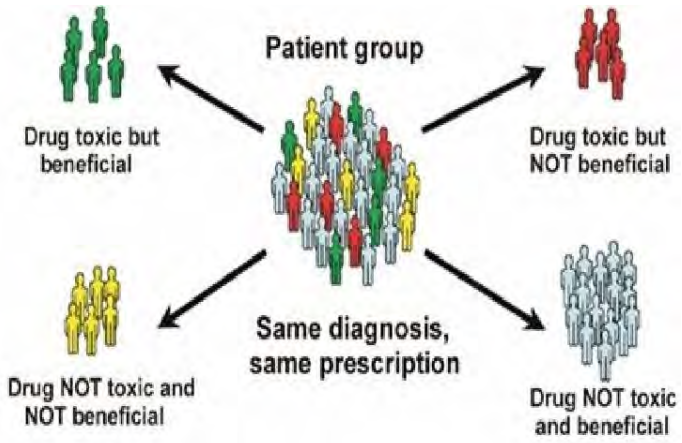


Figure 24 *: Principe expliquant l'intérêt de la médecine personnalisée*

La salive, avec tous ses potentiels physiques, chimiques, et biologiques deviendrait en association avec ses biomarqueurs et les nouvelles nanotechnologies le fluide biologique de référence pour cette médecine de demain élaborée pour l'individu et non plus liée à l'application d'un protocole pour un groupe d'individu.

5 PROJET CLINIQUE

Ces dernières années ont vu l'émergence de la nanotechnologie et l'essor des startups avec des idées plus ou moins révolutionnaires.

Dans le domaine médical, l'intérêt pour les biomarqueurs, au vue du nombre d'articles enregistrés sur Pub Med, a explosé ces dernières années, comme le montre la figure ci-dessous.

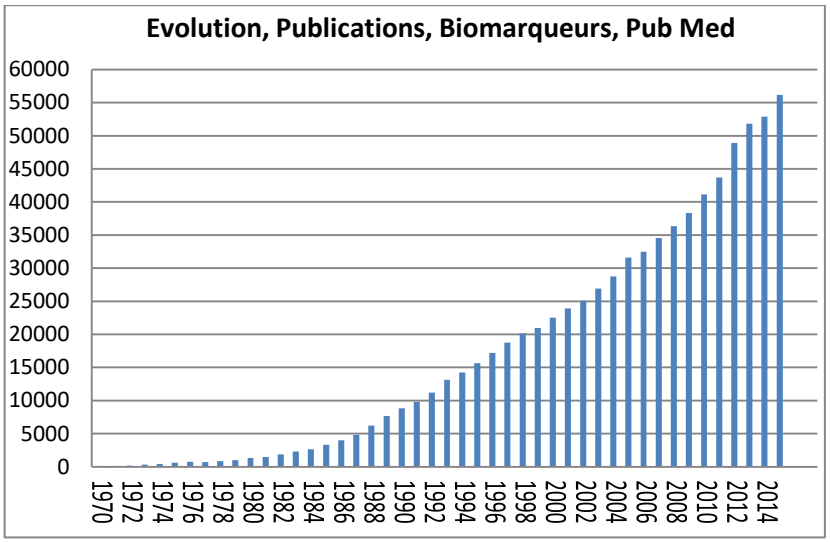


Figure 25 *: Diagramme représentant l'intérêt croissant pour les biomarqueurs*

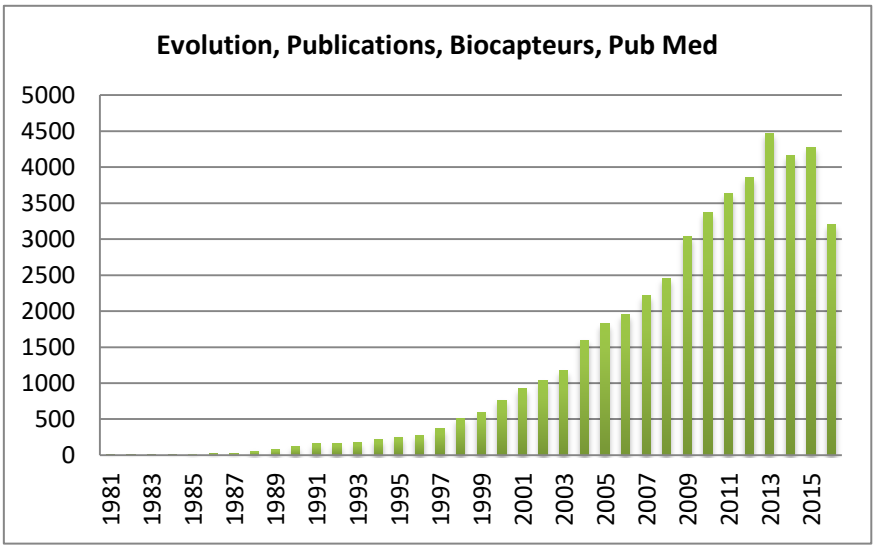


Figure 26 *: Diagramme représentant l'intérêt croissant pour les biocapteurs*

Le développement des biocapteurs a suivi l'explosion des progrès en nanotechnologie. La figure ci-dessus nous montre une seule publication en 1981 pour atteindre 4467 publications en 2013 ! Il existe donc un essor réel et innovant de ce sujet dans la recherche médicale.

5.1 Objectifs

5.1.1 Objectif principal de l'étude

L'objectif principal de ce travail est d'étudier les variations du microbiote salivaire par l'analyse taxonomique en fonction de la glycémie sanguine sur une cohorte de 20 patients.

5.1.2 Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires de cette étude seront :

- ✓ L'évaluation de la composition biochimique de la salive
- ✓ L'évaluation de la composition microbiologique de la salive après culture bactérienne

5.2 Matériels et Méthodes

5.2.1 La conception de l'étude et critères d'inclusions.

5.2.1.1 Choix de notre cohorte

Nous avons donc réalisé une étude descriptive de la glycémie sanguine à jeun et post prandiale comparée aux paramètres salivaires étudiés dans une population de 20 jeunes adultes avec un ratio de 50/50 femelles / mâles.

Pour cela, nous avons recruté de jeunes étudiants de la faculté de chirurgie dentaire de Toulouse afin d'évaluer leur état bucco-dentaire, d'examiner leurs habitudes alimentaires, leur hygiène bucco-dentaire ou encore leur ressenti vis-à-vis de leur santé et de leur bien-être. Cette évaluation s'est faite à l'aide d'un questionnaire individuel et anonyme. (Voir Annexes)

Cela nous a permis d'obtenir des résultats témoins que l'on pourra dans le futur comparer à ceux obtenus avec une cohorte de diabétiques.

Notre étude a permis d'inclure 20 sujets avec une moyenne d'âge de 24,1 ans pour les hommes et de 23,6 ans pour les femmes.

5.2.1.2 Critères d'inclusion:

- ✓ Etre un sujet sain
- ✓ Etre d'accord pour répondre à un questionnaire hygiéno-diététique
- ✓ Accepter des analyses biologiques
- ✓ Comprendre le formulaire de consentement
- ✓ Accepter de participer dans ces conditions

5.2.1.3 Caractéristiques biologiques :

- ✓ La salive stimulée a été recueillie après avoir mâché un bloc de paraffine stérile pendant 1 minute.

5.2.1.4 Caractéristiques médicales et sociodémographiques:

La collecte des données médicales et sociodémographiques a été réalisée à l'aide d'un questionnaire standardisé portant sur :

- ✓ La fréquentation des services médicaux et dentaires (raisons pour la dernière visite chez le dentiste, niveau de stress marqué sur une échelle de 10 points, fréquence des visites).
- ✓ Les comportements liés à l'hygiène buccale (nombre de brossage quotidien, temps de brossage).

5.2.1.5 Recueil des données

La mise en œuvre de l'étude a eu lieu dans la journée du 13 mai 2017 dans le Service d'Odontologie du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse.
Toutes les données ont été recueillies selon les mêmes conditions de procédure.

Lors de la consultation clinique, nous avons réalisé:

- ✓ une prise de sang à jeun et un prélèvement salivaire (dans les conditions précédemment décrites) à 8h00.
- ✓ une autre prise de sang post prandiale suivie d'un prélèvement salivaire à 14H00.
- ✓ la collecte du questionnaire hygiéno-diététique et nutritionnel complété par les sujets participant à cette étude.

5.2.2 Types d'analyses réalisées

Afin de voir s'il y a une possible corrélation entre les facteurs métaboliques, protéiques et microbiologiques du flux salivaire et la glycémie sanguine, il a été réalisé trois types d'analyses. Les dosages biochimiques sur la salive ont été réalisés par la Société VAIOMER implanté à Labège (31670).

5.2.2.1 Analyse des Métabolites

Les métabolites recherchés sont :

Cholestérol (mmol/L)	Glucose PAP (mmol/L)	Triglycérides (mmol/L)	AGL (mmol/L)

L'analyse de la glycémie a été réalisée par des capteurs glycémiques prêtés par l'INSERM.

***Figure 27** : Capteur glycémique Performa utilisé pour notre étude*

5.2.2.2 Analyse enzymatique

Protéines totales (g/L)	Amylase (U/L)	Lipase (U/L)

Nb : C'était la première fois qu'il était demandé au laboratoire d'analyses Vaiomer de réaliser la recherche de ces facteurs dans la salive, prouvant une nouvelle fois l'aspect novateur de notre étude.

5.2.2.3 Analyse du microbiote

- ✓ La flore microbienne a été étudiée de façon quantitative par ensemencement sur des plaques d'agar non sélectives ou sélectives, permettant ainsi la culture et l'identification des bactéries présentes dans la salive analysée. La détermination du nombre de bactéries putatives a été effectuée selon les critères décrit dans le «Bergey's Manual of determinative Bacteriology » (95).

- ✓ La salive a été congelée à -80°C pour l'analyse qualitative, taxonomique du microbiote oral.
    - Les extractions d'ADN à partir des prélèvements salivaires ont été réalisées dans le laboratoire de l'INSERM Unité 2 sous l'œil averti des chercheurs et techniciens de cette unité. J'ai pu donc extraire l'ADN de ces échantillons en utilisant un kit d'extraction *(QIAamp cador Pathogen Mini Kit 250).* Le protocole détaillé est joint en annexes.
    - Une fois la réalisation de l'extraction faite, nous avons passé tous nos échantillons au Nanodrop permettant ainsi de calculer le ratio d'absorption à 260nm et à 280 nm, et d'estimer la quantité d'ADN récupérée par échantillon. (Voir Tableau 10 en annexe)
    - Nous avons ensuite préparé les échantillons afin de les envoyer à séquencer dans le laboratoire de la Société VAIOMER SAS. La totalité de la région V2 de l'ADN bactérien 16S a été ciblée par les amorces 28F-519R et la technique MiSeq a été appliquée pour générer une moyenne de 10000 séquences par échantillon.

5.3 Résultats

Notre étude porte sur une cohorte de 20 étudiants (10 femmes et 10 hommes). Nous avons prélevé la salive et le sang des participants dans deux conditions à jeun (8H du matin) et puis nourris (14H de l'après-midi). Nous avons cherché à cibler les paramètres salivaires qui varient dans cette étude dans le but de trouver les biomarqueurs les plus pertinents pour une éventuelle application chez les diabétiques.

5.3.1 Comparaison des paramètres généraux

Le tableau ci-dessous, nous présente les caractéristiques des participants à notre étude selon les critères préalablement décrits dans Matériel et Méthodes et le questionnaire joint en Annexes.

Comparaison des paramètres généraux entre hommes et femmes					
Paramètre	Hommes (n=10)		Femmes (n=10)		**Significativité**
	Moyenne	(±) Ecart type	Moyenne	(±) Ecart type	
Age (ans)	23,67	1,12	24,08	2,60	0.8189
Poids (Kg)	**72,33**	**10,74**	**53,00**	**4,51**	**<0,0001 *****
Taille (cm)	**178,00**	**6,36**	**163,92**	**4,91**	**0,0003 *****
Nbre de brossage de dents/jour	2,11	0,33	2,29	0,43	0,2927
Temps de brossage en minutes	1,78	0,26	1,90	0,35	0,1060
Fréquence de consultation /an	**0,64**	**0,28**	**1,25**	**0,56**	**0,0111***
Niveau de Stress/ Echelle de 1 à 10	**1,22**	**0,44**	**3,17**	**1,91**	**0,0031****

Tableau 3 *: Comparaison des paramètres généraux entre hommes et femmes*

- ✓ Les résultats montrent, logiquement, une différence significative au niveau du poids et de la taille entre les hommes et les femmes.
- ✓ Les habitudes alimentaires données dans le Tableau 9 ne montrent pas de différence en comparant les deux sexes, mise à part la consommation de sodas plus élevée chez les hommes.

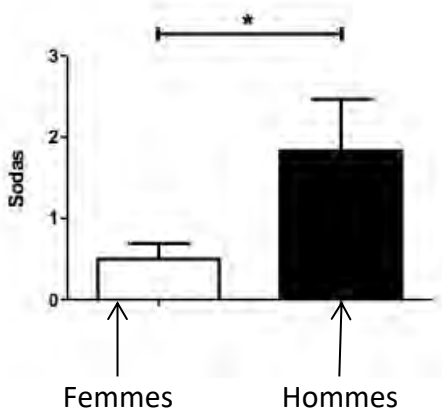


Figure 28 *: Indicateur de la consommation de sodas des sujets de l'étude*

- ✓ Une différence est notable au regard du nombre de consultations chez le chirurgien-dentiste avec un p=0,0111 et au stress occasionné p=0,0031. Ces résultats sont plus élevés chez la femme que chez l'homme.

5.3.2 Bilan lipidique salivaire et glycémie sanguine à jeun

Dans un premier temps, sur les échantillons recueillis, nous avons analysé des paramètres métaboliques et enzymatiques. Nous avons étudié plus en détail les résultats obtenus sur les hommes et sur les femmes à jeun. Les données obtenues après une prise alimentaire montraient une trop grande variabilité, qui en compliquait l'interprétation.

Nous n'avons pas pu mesurer le glucose salivaire par manque de sensibilité de la technique utilisée. Néanmoins de nombreuses études ont déjà montré que la salive pouvait être représentative de la circulation générale (96), en particulier le taux de glucose salivaire pour les diabétiques et non diabétiques.

Le tableau ci-dessous, donne les résultats des bilans lipidiques obtenus dans les deux populations d'hommes et de femmes à jeun.

Comparaison bilan lipidique salivaire et glycémie sanguine à jeun entre les hommes et les femmes					
Paramètre	Hommes (n=10)		Femmes (n=10)		**Significativité**
	Moyenne	(±) Ecart type	Moyenne	(±) Ecart type	
Glycémie sanguine (mg/dL)	88.00	6.38	87.00	8.07	0,9149
Amylase (U/L)	792,14,	444,19	1107,50	343,30	0,1658
Lipase (U/L)	35,10	27,52	22,49	23,00	0,3554
Cholestérol (mmol/L)	**0,71**	**0,26**	**0,40**	**0,27**	**0,0329***
Glucose PPA (mmol/L)	0,05	0,03	0,03	0,02	0,2933
Protéines Totales (g/L)	13,83	2,55	12,74	5,12	0,5458
Triglycérides (mmol/L)	**0,24**	**0,15**	**0,09**	**0,04**	**0,0060****
AGL (mmol/L)	**0,25**	**0,18**	**0,08**	**0,06**	**0,0049****

Tableau 4 *: Comparaison bilan lipidique salivaire et glycémie sanguine à jeun entre les hommes et les femmes*

- ✓ L'étude montre que le taux de cholestérol (p=0,0329), d'acides gras libres (p=0,0049) et de triglycérides (p=0,0060) à jeun chez les hommes est significativement plus augmenté que chez les femmes. Cette constatation peut s'expliquer par une alimentation plus grasse et plus sucrée des hommes que des femmes. (sodas, fast food, etc...).

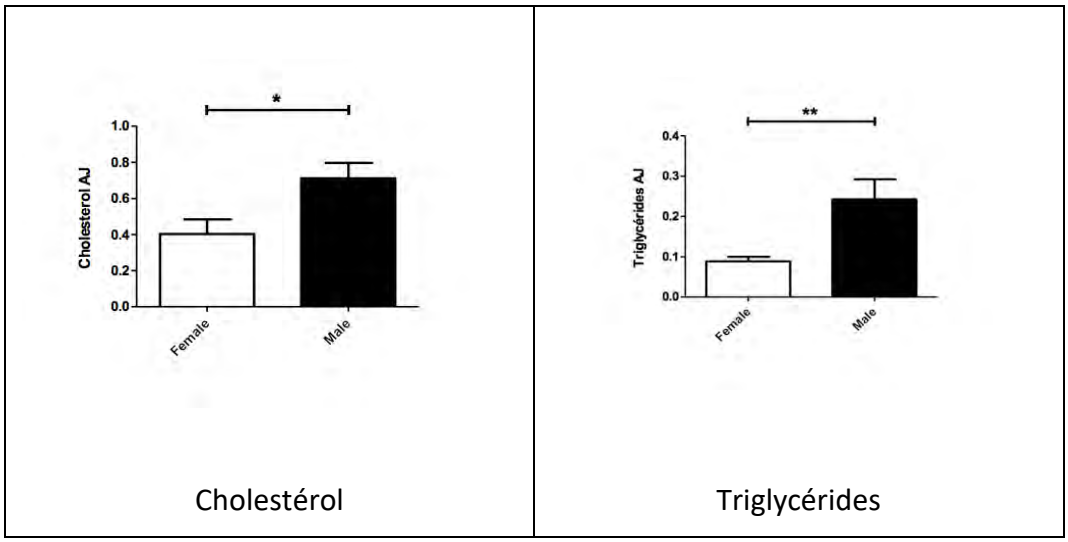


Figure 29 : *Indicateur de la différence entre les hommes et les femmes : cholestérol, triglycérides*

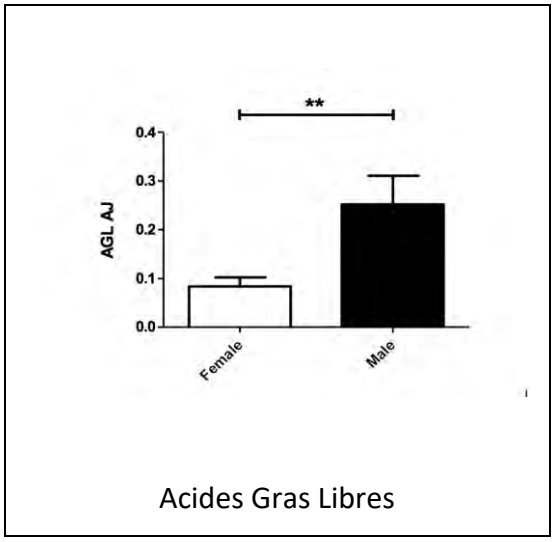


Figure 30 *: Indicateur de la différence entre les hommes et les femmes : acides gras libres*

Ces résultats sont en partie confirmés dans la littérature, notamment le taux de cholestérol à jeun chez l'homme est supérieur à celui constaté chez la femme (97).

5.3.3 Bilans lipidiques salivaires et glycémie sanguine à jeun et nourri

Nous avons prélevé la salive et le sang des participants dans deux conditions à jeun (8H du matin) et puis nourris (14H de l'après-midi). Dans le tableau ci-dessous, on présente la comparaison des taux de certains métabolites et de certaines activités enzymatiques dans ces deux types d'échantillons.

Comparaison bilans lipidiques salivaires et glycémie sanguine à jeun et nourri des hommes et des femmes confondus			
	Hommes et Femmes confondus		
Paramètres étudiés	Taux à jeun	Taux nourri	Significativité
Glycémie sanguine (mg/dL)	87,50	109,68	**<0,0001 *****
Amylase (U/L)	949,82	962,40	0,9338
Lipase (U/L)	28,79	12,37	0,0093 **
Cholestérol (mmol/L)	0,56	0,15	**<0,0001 *****
Glucose PPA (mmol/L)	0,04	0,71	0,3428
AGL (mmol/L)	0,16	0,07	0,0231*
Triglycérides (mmol/L)	0,15	0,11	0,3431
Protéines totales (g/L)	13,20	9,03	0,0248*

Tableau 5 *: Comparaison bilans lipidiques salivaires et glycémie sanguine à jeun et nourri des hommes et des femmes confondus*

Nous présentons ici les résultats sur la glycémie sanguine. Malheureusement nous n'avons pas pu calculer la glycémie salivaire, dû au manque de sensibilité des capteurs utilisés pour la détection du glucose. (Coffret set performa Lecteur glycémie mg/dL avec pour méthode de conversion: mg/dL x 0.0555 = mmol/L).

- ✓ Trois paramètres varient de façon significative après une prise de nourriture :
  - La lipase
  - Le cholestérol
  - Les acides gras libres (AGL)

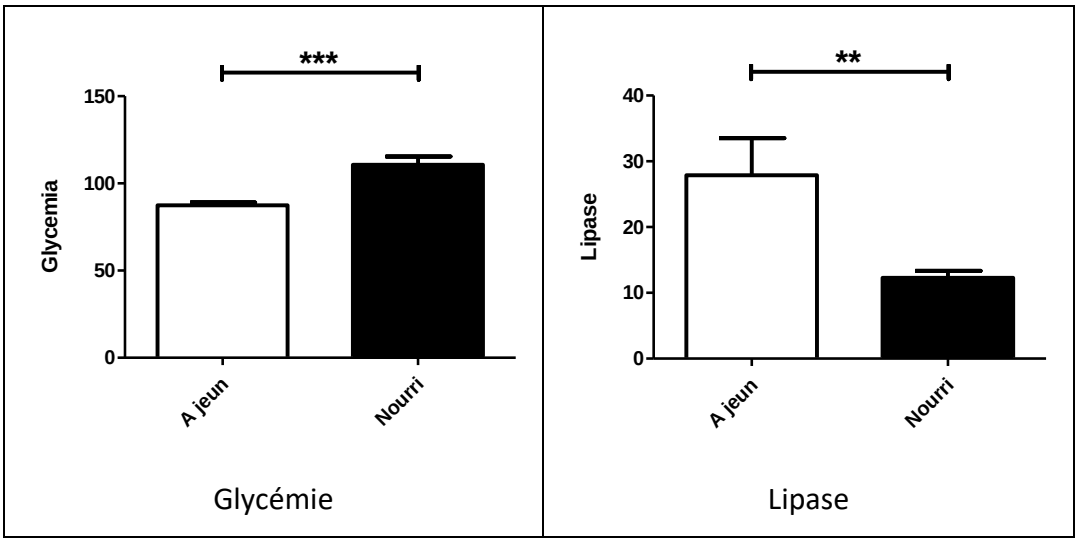


Figure 31 *: Comparaison Glycémie sanguine, Lipase sur les sujets à jeun et nourris*

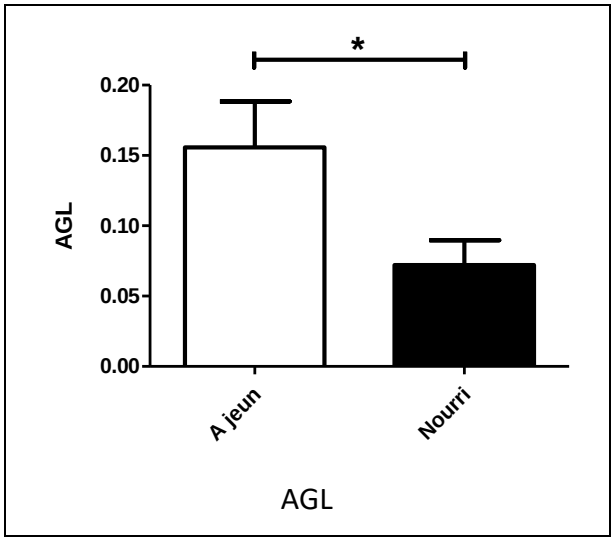


Figure 32 *: Comparaison AGL salivaires sur les sujets à jeun et nourris*

Vu les changements d'activité lipase après la prise alimentaire, il nous paraissait primordial d'analyser de possibles différences dans les taux de lipase entre les individus en fonction de leur niveau de glycémie.

La glycémie sanguine varie-t-elle positivement ou négativement en lien avec un des paramètres évalués ? On appelle cela une étude de « Corrélation linéaire ».

Deux paramètres de notre étude semblent être corrélés avec la glycémie sanguine : L'activité lipase et le nombre de bactéries, ce que nous allons traiter plus tard.

La figure ci-dessous présente les résultats des sujets à jeun pour l'activité lipase.

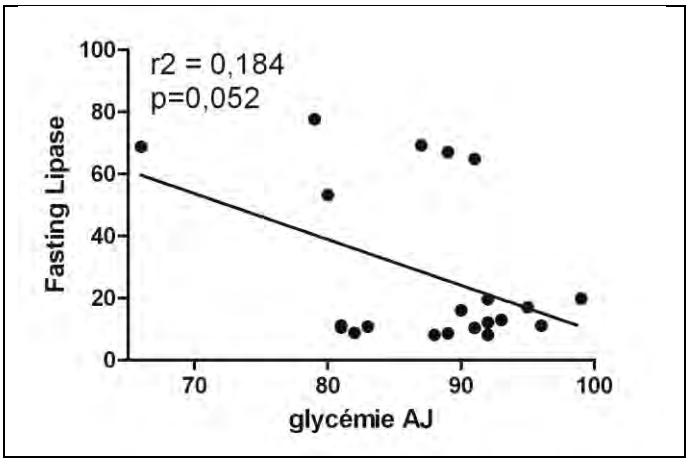


Figure 33 *: Corrélation entre l'activité lipase salivaire et la glycémie sanguine*

On peut constater une corrélation inverse entre la glycémie sanguine et la lipase salivaire. Ces résultats confortent l'hypothèse que les dosages salivaires pourraient se révéler être des indicateurs de l'état de santé de l'individu et cela laisse entrevoir des dosages de lipase en tant que biomarqueurs des maladies métaboliques

Nous reviendrons sur le rôle de cette lipase salivaire dans la régulation de l'appétit dans la discussion.

5.3.4 Résultat de l'Analyse en Composantes Principales (PCA)

D'après le questionnaire sur leurs habitudes alimentaires et leurs hygiènes bucco-dentaires ainsi que grâce aux analyses lipidiques effectuées sur chacun des 20 étudiants, nous avons réalisé ce que l'on appelle une PCA ou ACP (Analyse en composantes principales).
Ce type d'analyse permet une étude multivariée qui a pour caractéristique de s'intéresser à la distribution conjointe de plusieurs variables, regroupant les paramètres les plus similaires entre eux tout en, en opposant d'autres. Notre analyse PCA permet d'étudier un éventuel lien entre : habitudes alimentaire/ hygiène de vie/bilan lipidique et la glycémie.

Figure 34 *: Analyse en Composantes Principales (PCA)*

On constate sur cette PCA avec les valeurs à jeun et nourri, une distinction hommes femmes, après avoir enlevé les paramètres de taille et de poids qui faussaient un peu les résultats. Les résultats nous montrent deux groupes presque totalement distincts. On pourrait ainsi distinguer un homme d'une femme rien que sur leurs bilans lipidiques !

On note aussi une relation opposée entre le taux en amylase et en glucose chez les sujets nourris. De même on constate une totale opposition entre l'amylase et le taux de glucose, de cholestérol et des triglycérides chez un sujet à jeun.
Mais il faut surtout remarquer l'opposition entre le taux de lipase salivaire et la glycémie sanguine chez un sujet à jeun, comme indiquée sur la figure ci-dessus.

Le rôle principal de cette lipase n'est peut-être pas essentiellement celui de la digestion mais plutôt celui de la production d'acides gras libres (AGL), jouant un rôle dans la régulation de l'appétit.

Nous reviendrons sur le rôle non défini de cette lipase salivaire dans la discussion.

5.3.5 Dosages microbiologiques

La flore microbienne des échantillons salivaires a été étudiée de façon quantitative par ensemencement sur des plaques d'agar. Voici les résultats du nombre de bactéries comptées dans les échantillons salivaires dilués à 10^{-5}, exprimés en UFC/mL (Unité Formant Colonie).

Nombre de Bactéries comptées dans les échantillons salivaires					
Paramètre	Hommes (n=10)		Femmes (n=10)		**Significativité**
	Moyenne	(±) Ecart type	Moyenne	(±) Ecart type	
UFC/mL Unité Formant Colonie	470,44	199,10	415,83	172,96	0,1537

***Tableau 6** : Nombre de bactéries comptées dans les échantillons salivaires*

On constate que le nombre de bactéries trouvées aussi bien chez les hommes que chez les femmes n'est pas significativement différent.
Ce nombre varie-t-il avec la glycémie sanguine ?
Dans la figure ci-dessous, nous avons effectué le même type d'analyse PCA, utilisée précédemment, pour répondre à cette question.

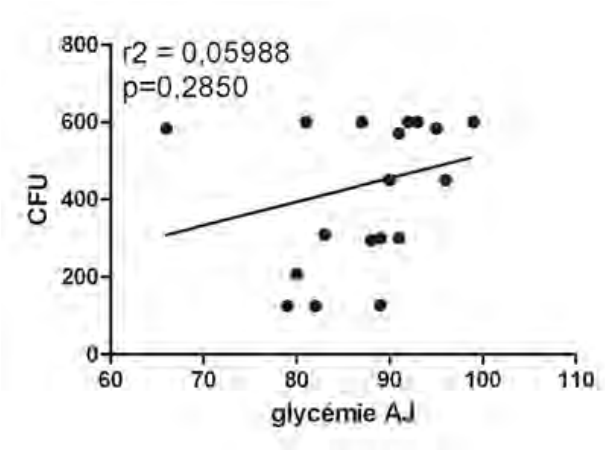


***Figure 35** : Nombre de bactéries en fonction de la glycémie sanguine à jeun*

Cette analyse nous montre que le nombre de bactéries dans un échantillon de salive semble corrélé à l'état de la glycémie sanguine du sujet. On constate une tendance à la corrélation positive entre le nombre d'unité formant colonies (UFC) et la glycémie sanguine.

Dans le chapitre suivant nous allons voir que ces résultats doivent être nuancés car certaines espèces bactériennes augmentent tandis que d'autres diminuent. Le microbiote salivaire pourrait donc être un biomarqueur utilisable dans le suivi des pathologies liées aux diabètes.

5.3.6 Résultats taxonomique du microbiote oral par séquençage de l'ADN salivaire total

Voici maintenant les résultats de notre étude taxonomique du microbiote oral des 20 sujets, nous avons choisi de séparer hommes et femmes pour éviter les biais et pour en étudier les possibles différences.

Nous cherchons ici à identifier si une bactérie particulière est significativement très présente dans les échantillons salivaires chez l'homme et la femme et si son taux varie en fonction du statut nutritionnel du sujet.

Ainsi on pourrait espérer que cette bactérie évoluerait avec la glycémie et ainsi pouvoir l'utiliser en tant que biomarqueur dans des maladies métaboliques comme que le diabète caractérisé par une hyperglycémie.

5.3.6.1 Mâles versus Femelles

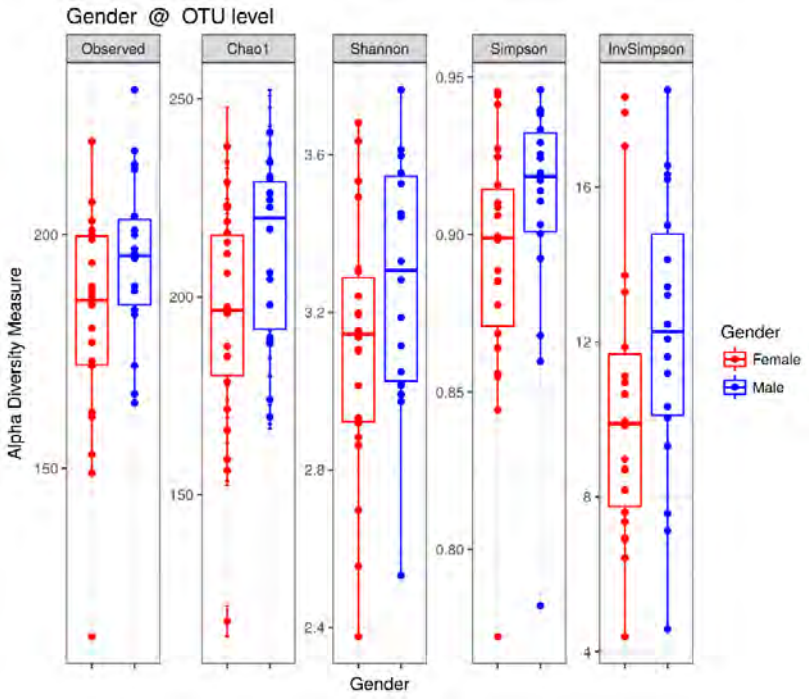


Figure 36 *: Marqueurs de la diversité du microbiote oral entre les hommes et les femmes*

On remarque que tous les marqueurs de diversité sont augmentés dans le groupe bleu représentant les hommes comparés aux groupes des femmes. Cela montre une différence significative quant à la diversité du microbiote entre sexes opposés.

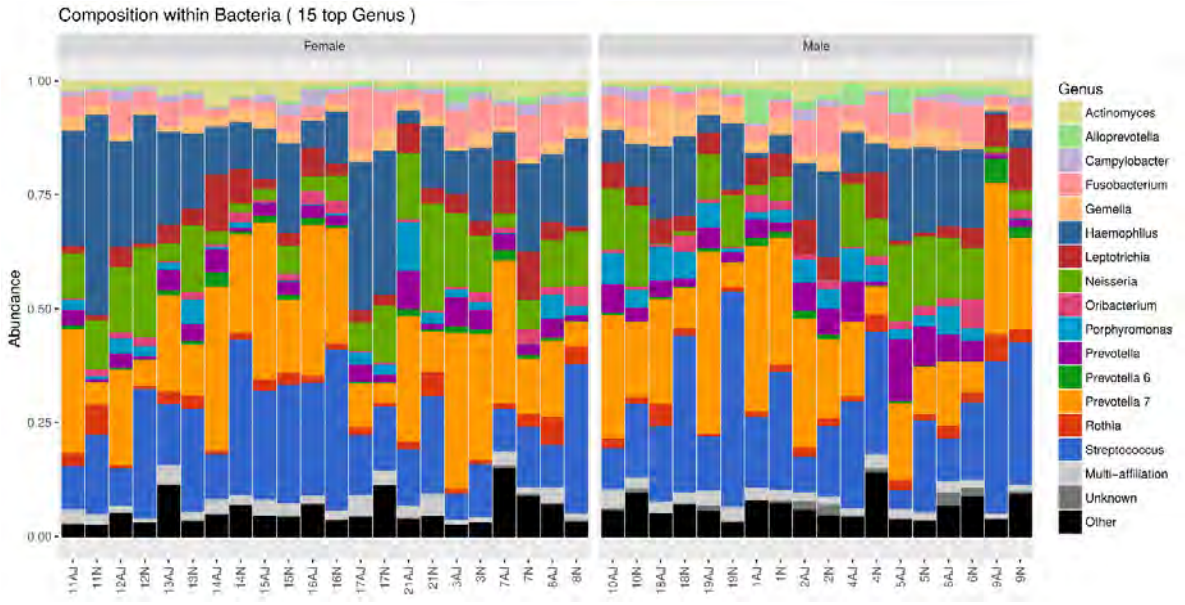


Figure 37 *: Top 15 Genres retrouvés dans les échantillons de notre étude.*

On constate une légère différence qualitative entre les hommes et les femmes notamment pour le genre *Haemophilus* plus présent chez les femmes que chez les hommes ainsi qu'une légère augmentation du genre *Streptococcus* chez l'homme.

Ces résultats ne sont pas suffisants pour montrer une différence dans le microbiote entre les hommes et les femmes.

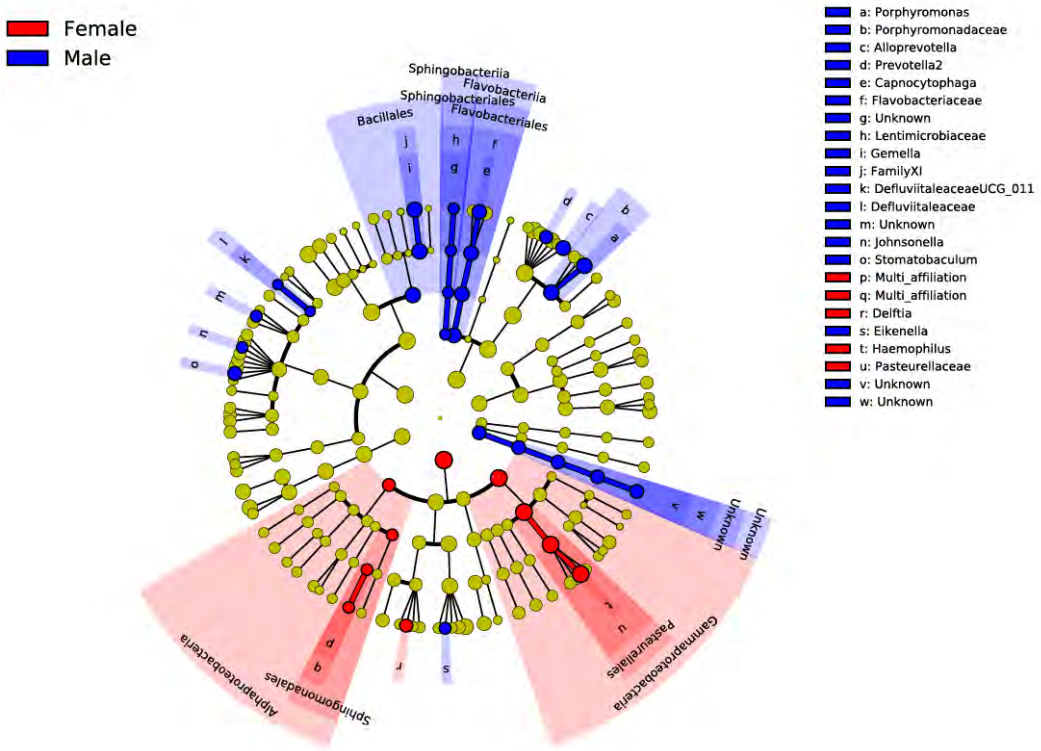


Figure 38 *: Analyse par cladogramme du microbiote des hommes et des femmes*

L'analyse par cladogramme permet d'identifier le genre *Porphyromonas* (appartenant au *Phylum des Bactéroïdètes*) ainsi que *Prevotella* (appartenant au même *phylum*), bien plus représentés chez l'homme.

Ceci peut être considéré comme une signature du microbiote oral chez l'homme.

A l'inverse le phylum XII des *Gamma-proteobacteria* et en particulier la famille *Pasteurellaceae* avec le genre *Haemophilus* semble caractériser le groupe des femmes.

5.3.6.2 Hommes nourris versus à jeun

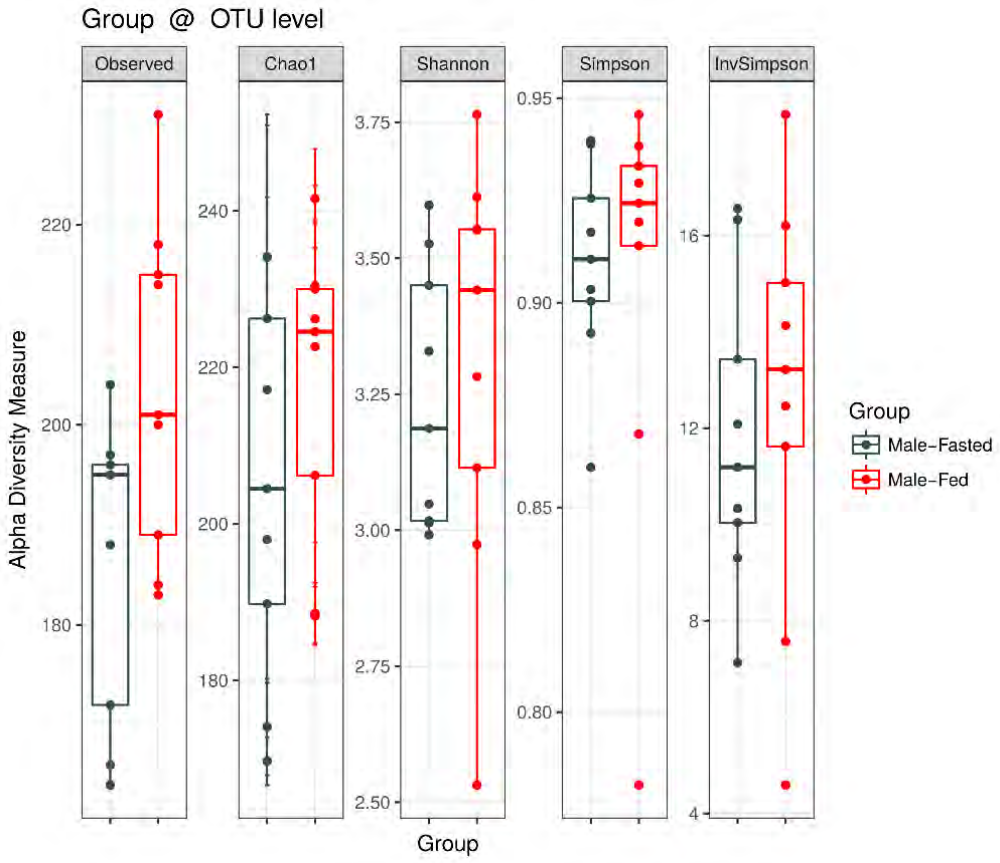


Figure 39 *: Marqueurs de la diversité du microbiote oral entre des hommes nourris vs à jeun.*

On remarque une plus grande diversité dans le groupe mâle-nourri selon tous les marqueurs de diversité par rapport au groupe mâle à jeun. Cette grande diversité est intéressante pour notre étude dans l'espoir de nouvelles cibles diagnostic.

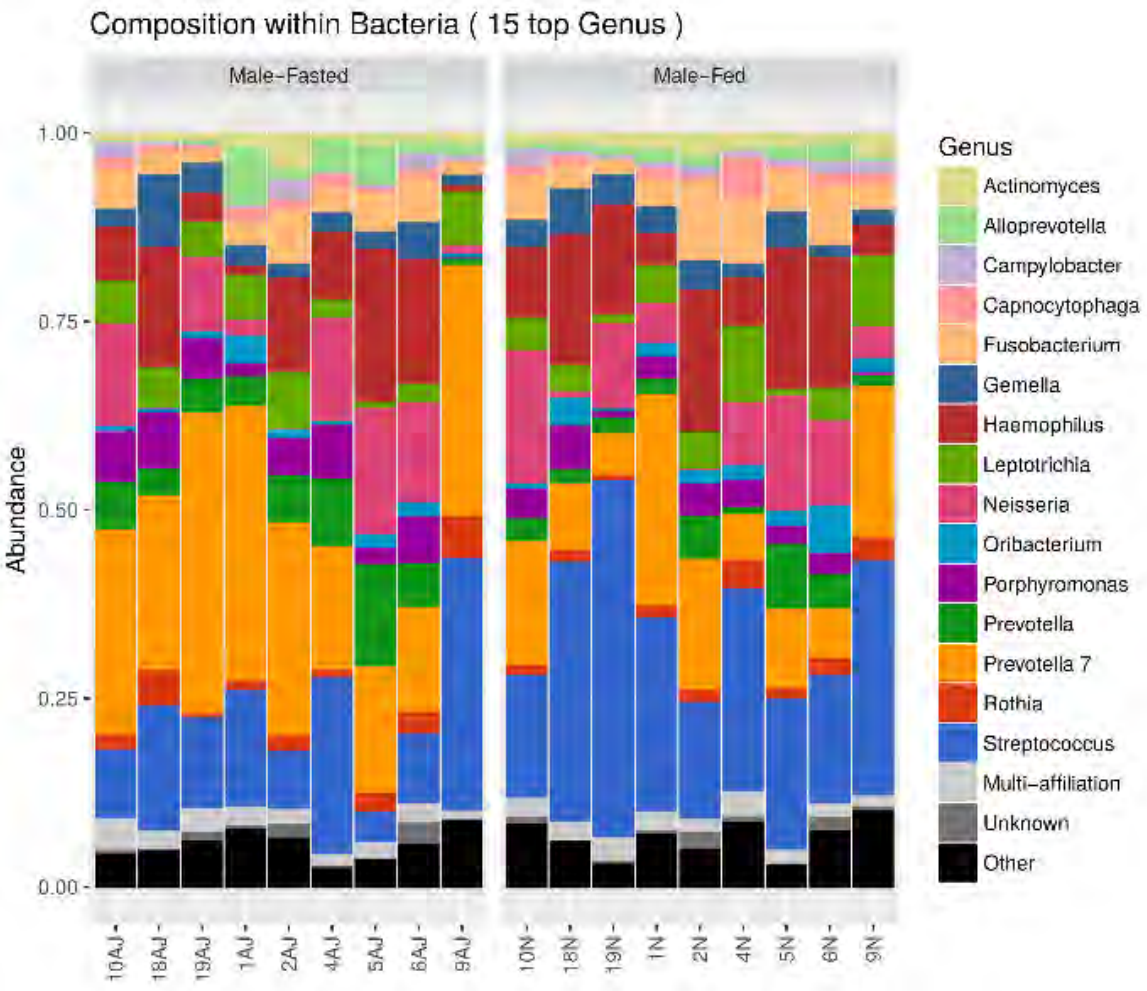


Figure 40 *: Top 15 Genres retrouvés chez les sujets mâles de notre étude*

On constate que le rapport change entre les genres *Prevotella 7* (*Phylum Bactéroïdètes*) et *Streptococcus* (*Phylum Firmicutes*) entre à jeun et nourris. En effet *Prevotella* 7 est fortement représenté chez les sujets à jeun. A l'inverse, *Streptococcus* est plus présent dans les échantillons nourris.

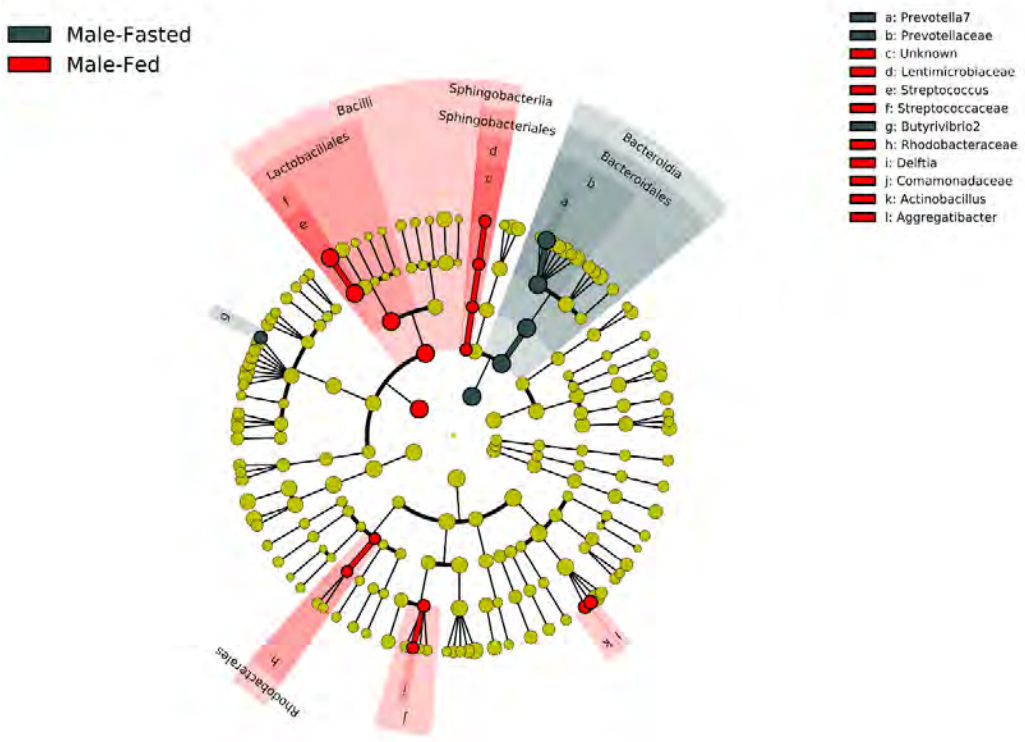


***Figure 41**: Analyse par cladogramme du microbiote des hommes à jeun et nourris*

On remarque que le microbiote oral évolue en fonction de l'état nourri ou à jeun et il est caractérisé par le genre *Prevotella 7*, à jeun. Les hommes nourris ont tendance à être caractérisé par le genre *Streptococcus.*

5.3.6.3 Femmes nourries versus à jeun

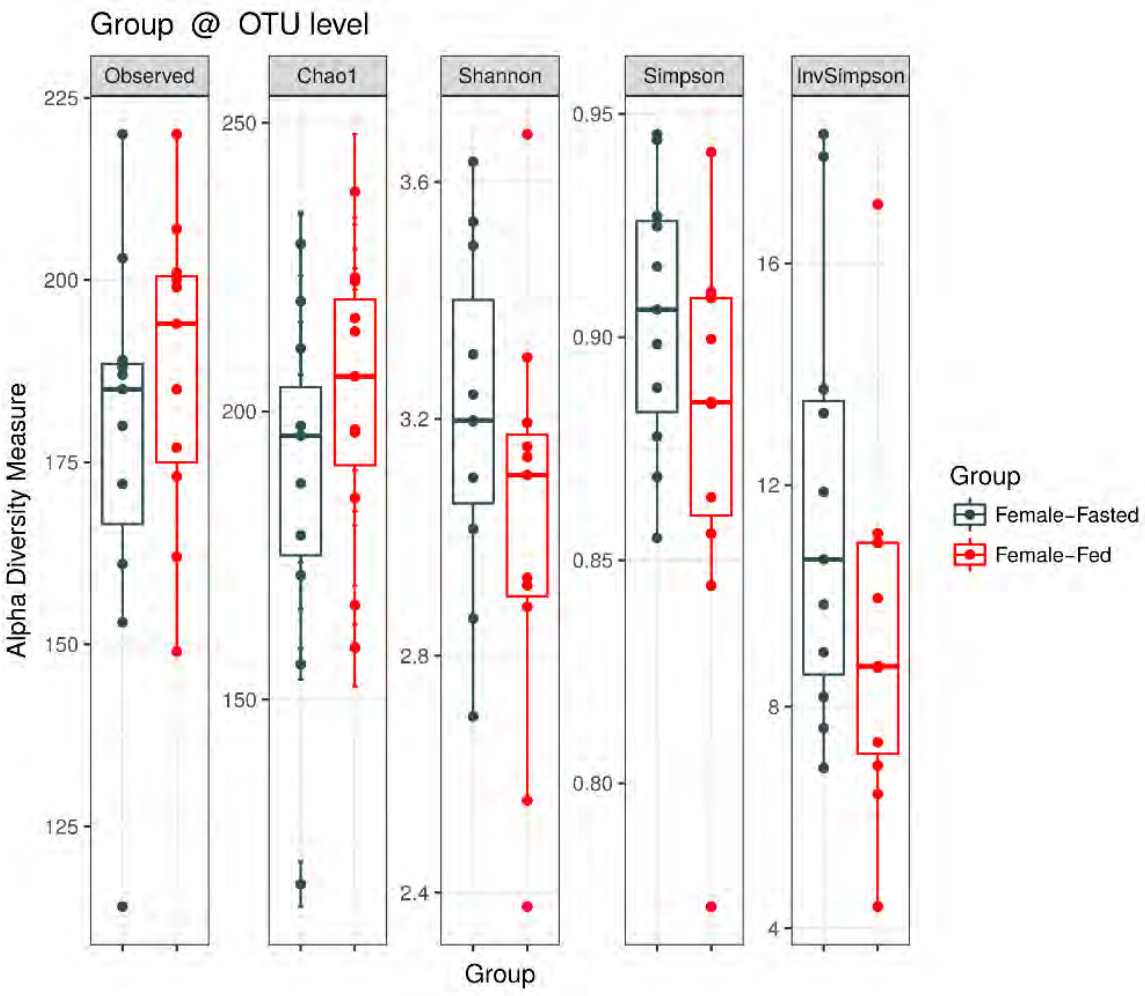


***Figure 42**: Marqueurs de la diversité du microbiote oral des femmes nourries vs à jeun*

La diversité est moins importante que dans le groupe des mâles, confirmant les résultats de la figure 36.

On constate aussi que la diversité à l'intérieur du groupe femelle varie selon le type de marqueurs utilisés ce qui ne nous permet pas de conclure à une quelconque diversité entre à jeun et nourris chez les femmes.

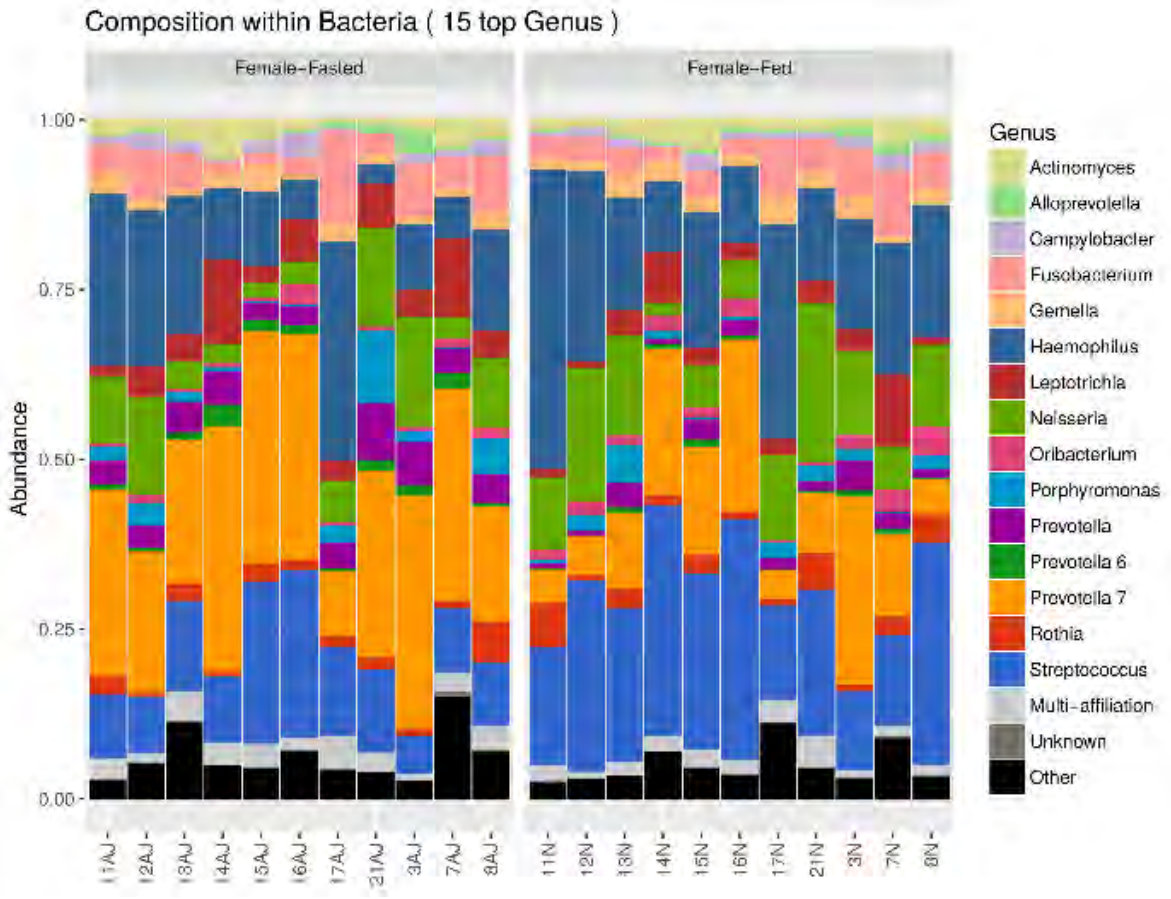


Figure 43*: Top 15 Genres retrouvés dans les échantillons femelles de notre étude*

On constate ici aussi chez les femmes que le rapport change, entre les genres *Prevotella* 7 (*Phylum Bactéroïdètes*) et *Streptococcus* (*Phylum Firmicutes*), entre à jeun et nourris.

En effet *Prevotella* est fortement représenté chez les sujets à jeun. A l'inverse *Streptococcus* est plus présent dans les échantillons nourris. On obtient donc des variations identiques à celle du groupe des hommes.

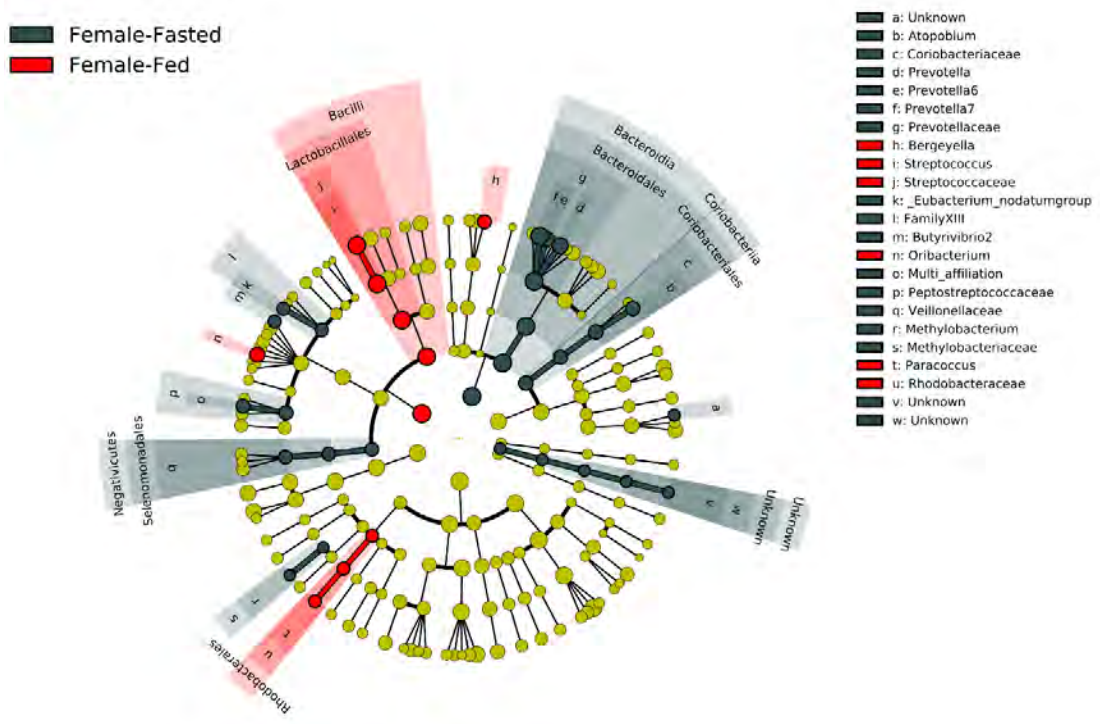


***Figure 44**: Analyse par cladogramme du microbiote oral des femmes à jeun et nourries*

On remarque que le regroupement des femmes à jeun est caractérisé par l'espèce *Prevotella* et que les femmes nourries sont caractérisées par l'espèce *Streptococcus*.

Pour conclure sur les résultats du microbiote oral, on constate que dans notre étude les rapports entre *Streptococcaceae* du *Phylum XIII* : *Firmicutes* et *Prevotellacalae* du *Phylum* XX : *Bactéroïdètes,* varient en sens inverse en fonction du moment de la journée (à jeun ou nourri).

Nb : Plusieurs études ont montré le lien entre microbiote intestinal et le régime alimentaire (98) (99) (100)*. Selon eux, Firmicutes et Prevotellacalae enterotype se retrouvent dans les régimes riches en carbohydrates et sucres simples (comme glucose ou fructose), alors que Bactéroïdètes est plus développé dans les régimes riches et saturés en gras et en protéines animales. Cela nous montre le lien entre microbiote oral et régime alimentaire, et donne une explication au fait que Bactéroïdètes soit davantage retrouvé chez les personnes obèses (régime plus gras)* (101) (102)*. Nous y reviendrons dans la discussion.*

5.4 Discussion

Tout d'abord deux aspects techniques de l'étude sont à considérer.

- ✓ Les conditions de prélèvement des échantillons. Nous avons prélevé de la salive après mastication. Le fait de travailler sur une salive « activée » peut influencer la production de métabolites et les activités des enzymes.
- ✓ Le prélèvement « post-prandial » : Les paramètres que nous avons étudiés varient dans le temps après un repas. Nous avons réalisé les prélèvements autour de 14h. Ce moment du prélèvement correspond à des intervalles de temps différents après le repas pour les étudiants impliqués dans cette analyse...

Peu d'articles sont publiés au sujet des niveaux de cholestérol et/ou des lipases dans la salive. Ce qui ne semble pas surprenant quand on sait que les analyses lipidiques salivaires demandées à la société Vaiomer à Labège ont été réalisées pour la première fois pour notre étude. On apprend cependant que ces paramètres peuvent être influencés par de multiples facteurs. Par exemple, une étude faite par Palmerini (103) met en évidence une grande disparité due au simple fait d'être fumeur ou non.

Nous pouvons cependant être rassurés par le fait que certains de nos résultats ont déjà été rapportés dans la littérature, par exemple la différence en cholestérol salivaire entre hommes et femmes (97).

5.4.1 Activités enzymatiques et métaboliques de la salive

Dans notre étude, nous avons vu une baisse significative, avec un p=0,0093, d'environ deux fois de l'activité lipase présente dans la salive après le repas.

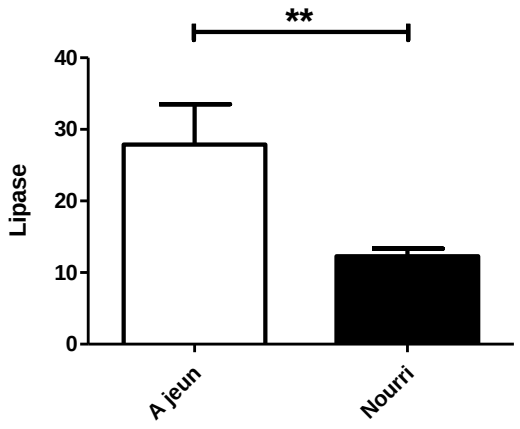


Figure 45 *: Indicateur de l'activité lipase à jeun et nourri*

Il serait intéressant de savoir à quoi correspond cette activité lipase ? En 1973, Hamosh (104) a démontré une activité lipase à partir d'analyse de langue de rat qui hydrolysait des triglycérides en diglycérides et acides gras libres (AGL) avec un pH optimum de 4,5 à 5,4. Cette lipase a été appelée lipase lingual ou LIPF.

Un des rôles principal pour cette activité est de libérer des AGL qui interagissent avec des récepteurs (CD36 et GPR120) pour moduler le goût « gras », dans ce cas on pourrait dire que « l'appétit vient en mangeant » ! (101) (102).

Bien qu'une activité de lipase lingual soit retrouvée également chez l'homme, le gène et la protéine responsable reste à être déterminés, car Voigt et al (106) montre que LIPF n'est pas exprimé chez l'homme dans la langue. D'autres lipases, tels les LIPK, LIPM, ou LIPN pourraient être responsables de cette activité lipase.

On constate que le gène impliqué dans cette activité lipase n'est pas encore identifié, ce qui ne nous empêcherait pas de l'utiliser comme biomarqueur.

L'activité des différentes lipoprotéines lipases (LPL) est régulée par l'insuline. Dans le tissu adipeux, l'activité LPL est plus élevée après la prise de nourriture (105). Cependant les lipoprotéines lipases du muscle squelettique et du cœur voient leurs activités diminuées dans ces conditions (105). Nos résultats préliminaires pour la salive montrent aussi une activité diminuée après le repas.

Ceci nous laisse à penser que les patients diabétiques de type 1 ou 2 pourraient présenter une activité lipase diminuée qui serait donc facilement dosable et détectable, ce qui constituerait un biomarqueur pour la confection d'un biocapteur futur !

Au niveau de l'introduction nous avons énuméré quelques critères pour une sélection de biomarqueurs potentiels.

Un biomarqueur potentiel doit :

- ✓ Etre facilement dosable ce qui est le cas pour une activité lipase.
- ✓ Ne pas montrer trop de variabilité entre les individus de la cohorte. En cela nos premiers résultats sont encourageants.
- ✓ Varier de façon spécifique dans la pathologie qui nous intéresse (diabète, par exemple). Il ne semblerait pas que les variations de l'activité lipase pourraient être vraiment « spécifiques » d'un diabète. Néanmoins les dosages de la glycémie, un paramètre relativement non spécifique, ont été exploités avec succès dans le suivi des patients diabétiques depuis de nombreuses années.

Enfin, certains des marqueurs que nous avons étudiés (cholestérol, lipase,…) sont également des déterminants clefs de la santé buccale (106) (107), ce qui ajoute un intérêt supplémentaire à nos recherches pour notre profession.

5.4.2 Le microbiote salivaire

5.4.2.1 Modulation par la glycémie

Comme nous l'avons vu dans l'Introduction (1.2.7.), le microbiote est un indicateur de l'état physiopathologie d'un tissu ou d'un organe. En effet, bien que chaque individu et chaque organe présentent un profil microbien distinct, on peut néanmoins constater des changements de microbiote qui permettraient de déceler une pathologie. Le microbiote salivaire a été caractérisé précédemment par Evadson (108) et Goodson (109) qui trouvent, comme nous, essentiellement des bactéries anaérobies. Dans nos études, des variations du nombre de plusieurs types de bactéries sont constatées après la prise alimentaire. En particulier, nous constatons une diminution de la proportion du *Phylum Bactéroïdètes* ainsi qu'une augmentation du *Phylum Firmicutes*.

Dans la littérature, les *phylums Bactéroïdètes* et *Firmicutes,* décrits aussi dans notre étude, sont étudiés, principalement dans le microbiote intestinal. Thomas et al (110) expliquent l'intérêt du *phylum Bactéroïdètes* dans la digestion de certaines fibres qu'on ne pourrait pas digérer sans elles. La plupart sont anaérobies, cette flore intestinale change donc en fonction du régime alimentaire suivi. Le *phylum Bactéroïdètes* (avec la présence sur sa membrane de Lipopolysaccharides (LPS) impliqué dans l'inflammation) aide aussi à la digestion des sucres complexes dans l'intestin, travail qu'on ne peut pas effectuer sans elles.

Le phylum Bactéroïdètes serait lui, selon certaines études, moins représenté dans la flore intestinale chez les souris et chez les hommes obèses (plus disposés à avoir un diabète de type 2).On ne sait pas encore de nos jours si *Bactéroïdètes* peut prévenir cette obésité ou si cette flore intestinale n'est pas plutôt préférée par les intestins des personnes non obèses. Ces résultats sont également rapportés dans l'article récent de Goodson et al (109).

L'autre *phylum* qui nous intéresse est le *phylum Firmicutes,* bactéries gram positif. L'article de Ley (111) sur le microbiote intestinal confirme nos résultats trouvés dans le microbiote buccal. Dans les deux cas, le taux de *Firmicutes* est bien plus élevé après un repas, et pourrait donc jouer un rôle notable dans l'obésité et dans le diabète.

Cette observation peut surprendre sachant qu'un certain nombre de bactéries buccales sont dépendantes du glucose pour leur croissance. L'hypothèse proposée par Goodson et al (109) est qu'une hyperglycémie perturbe le profil bactérien oral en changeant l'acidification de la bouche (acidité bénéfique pour *Firmicutes* et néfaste pour *Bactéroïdètes*)

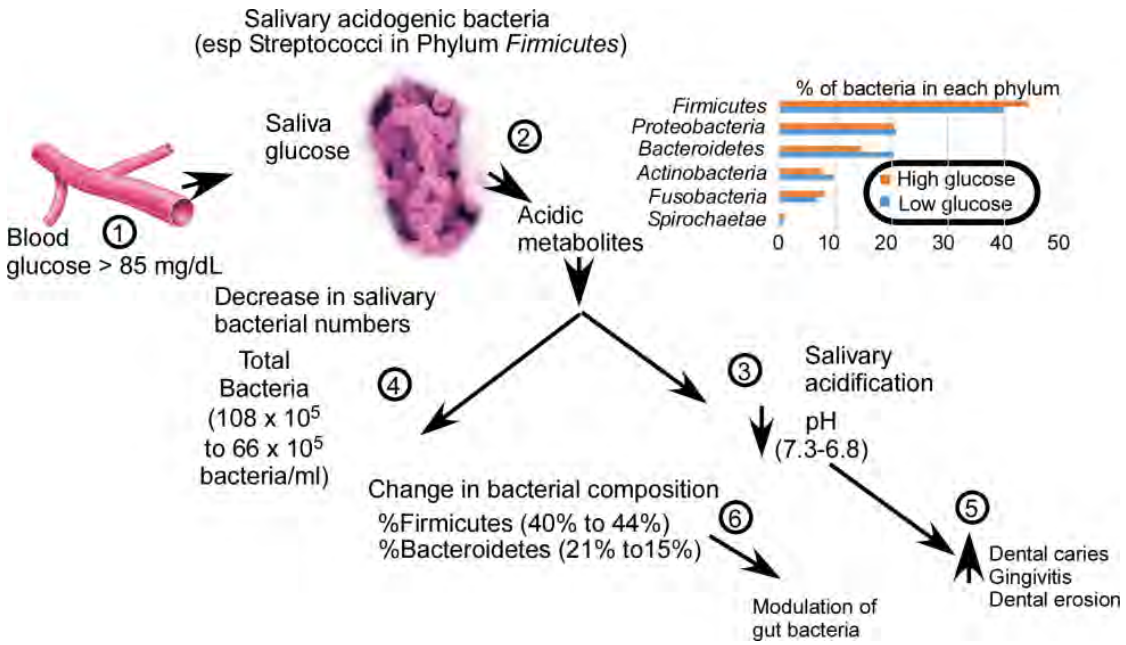


Figure 46 *: Hypothèse de Goodson & al pour expliquer les changements du microbiote salivaire en réponse à des concentrations en glucose élevées*

Un des intérêts de cette hypothèse est la prédiction que l'hyperglycémie salivaire, modulateur du microbiome dans notre étude et celle de Goodson, pourrait être aussi retrouvée dans le diabète de type 2 (T2D). Nous aurions, dans ce cas, un biomarqueur intéressant à suivre dans le cas du T2D. N'oublions-pas, non plus, l'intérêt évident que présentent les analyses de profils bactériens comme biomarqueurs de l'état de santé buccodentaire (112) (113).

5.4.2.2 Biocapteurs et microbiote

Le développement des biocapteurs pour quantifier le microbiote *in vivo* est-il possible ? Plusieurs techniques de quantification ont été utilisées, par exemple avec les dosages d'ADN bactérien (114), mais ces techniques nécessitent une lyse bactérienne qui ne semble pas facilement adaptables à une utilisation *in vivo*.

Cependant, quand une étude sur le microbiote oral aura permis d'identifier deux ou trois espèces bactériennes cibles, il sera possible d'envisager l'utilisation de biocapteurs à dosages optiques ou électrochimiques avec des anticorps dirigés contre ces bactéries cibles. Ces méthodes plus simples ont déjà permis la construction de biocapteurs « bactériens » qui fonctionnent *in vitro*, par exemple leur utilisation pour des dosages d'eaux polluées (115) et (116). Seraient-elles applicables *in vivo* ? (117).

5.4.3 La dent « connectée » : rêve ou réalité ?

En tant que chirurgien-dentiste, nous rêvons… d'un biocapteur inséré dans ou sur une dent qui nous informerait en temps réel de notre santé bucco-dentaire, voire de notre état général. Cet espoir a motivé ma thèse !

Depuis les années 1950, des avancées considérables sont réalisées dans le domaine des « biocapteurs », comme l'illustre cette figure (118).

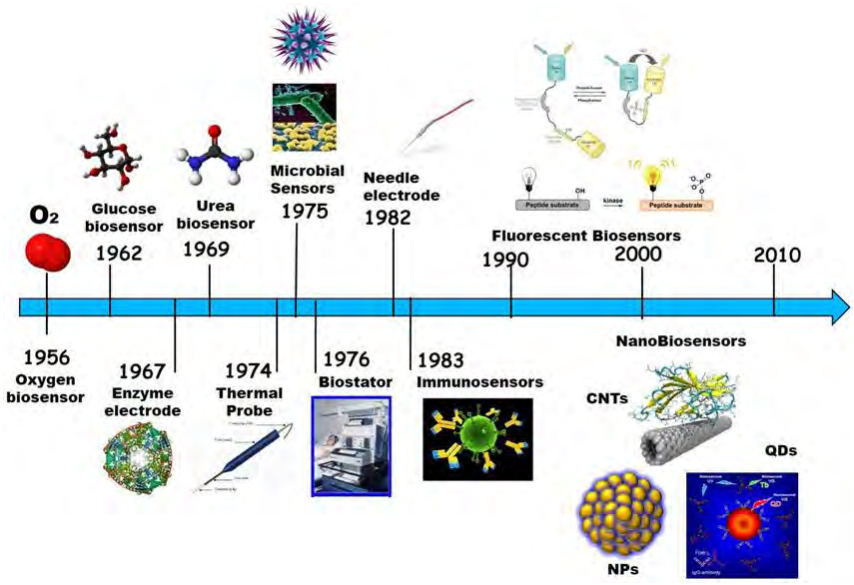


Figure 47 *: Evolution des biocapteurs dans le temps*

En 2012 une contribution majeure est proposée par Mannoor et al (119) pour la réalisation d'une dent connectée. Ces auteurs rapportent la « greffe » sur une dent d'un « nanocapteur » en graphène :

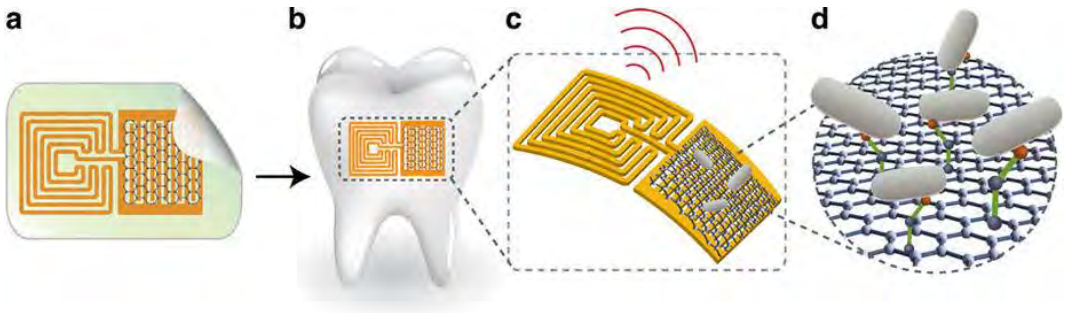


Figure 48 *: Illustration d'un capteur de bactéries sur une dent par Mansoor (119)*

Ces pionniers ont exploité l'existence de peptides antimicrobiens (antimicrobial peptides ou (AMPs)) qui existent dans la nature pour détecter certaines espèces telles que *E.coli, H. pylori* ou *S.aureus.* Ils montrent qu'il est possible de détecter la liaison d'une seule bactérie sur un capteur: donc une technologie très sensible, mais qui ne permet pas l'identification de la bactérie.

La construction de biocapteurs pour la cavité buccale a été le sujet d'une revue récente par Lakshmi et al (84) sur les différentes études de biocapteurs salivaires :

Disease	Target/biomarker	Biosensor	Reference
Caries	*Streptococcus mutans*	Fiber-optic biosensor	Kishen *et al.*[13]
	sAA	sAA biosensor	Shetty *et al.*[15]
Periodontitis	IL-1β	Lab-on-a-chip multiplex biosensor	Ji and Choi[17]
	MMP-8		
Oral cancer	IL-8	Optical protein sensor	Tan *et al.*[21]
	EGFR	Nano-biochip cellular analysis sensor	Weigum *et al.*[22]
	mi-RNA	Electrochemical biosensor	Wang *et al.*[23]
Diabetes mellitus	Glucose	Salivary nanobiosensor	Zhang *et al.*[26]
HIV	Immunoglobulin	Electrochemical peptide-based sensors	McQuistan *et al.*[27]
Stress induced disorders	Cortisol	Flow filtered ported SPR biosensor	Stevens *et al.*[30]
Male hypogonadism	Testosterone	Nanoparticle-enhanced SPR biosensor	Mitchell and Lowe[32]
Cardiovascular disease	CRP	Microchip assay biosensor	Christodoulides *et al.*[41]
	Lactate	Electrochemiluminescence biosensor	Ballesta Claver *et al.*[43]
Hyperphosphatemia in chronic renal failure	Phosphate	Amperometric biosensor	Kwan *et al.*[45]
Obesity	Phosphate	Amperometric biosensor	Kwan *et al.*[45]
	Uric acid	Mouth guard biosensor	Kim *et al.*[49]
Breast cancer	ATP6AP1	Quartz crystal biosensor	Arif *et al.*[52]
	CA15-3, CEA	Surface plasma resonance biosensor	Liang *et al.*[53]
	CA125	Multiplexed microfluidic biosensor	Jokerst *et al.*[54]
	HER-2/ neu (C-erbB-2)		

SPR: Surface plasmon resonance, sAA: Salivary α-amylase, IL: Interleukin, MMP: Matrix metalloproteinases, EGFR: Epidermal growth factor receptor, mi-RNA: Micro-RNA, CRP: C-reactive protein, CEA: Carcinoembryonic antigen, CA125: Cancer antigen 125, HER-2: Human epidermal growth factor receptor-2, HIV: Human immunodeficiency virus

***Tableau 7** : Tableau de Lakshmi sur les biocapteurs salivaires proposés pour le diagnostic de diverses pathologies*

Du rêve à la réalité, notre future dent connectée, bien qu'elle ne soit ne pas encore une réalité clinique, anime les recherches de nombreux curieux !

CONCLUSION

« Oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance. » David T Wong

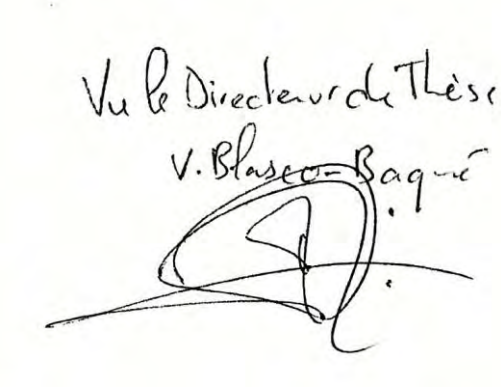
La pratique de l'odontologie présente un aspect de médecine générale non négligeable avec l'avènement de la prise en charge globale du patient. Il est donc indispensable de connaître les aspects biologiques et systémiques de la pratique clinique du chirurgien-dentiste. Nous ne pouvons pas résumer notre profession à de simples techniciens soignant les dents, en effet le chirurgien-dentiste devient un acteur en première ligne de la prévention et du dépistage des principales pathologies systémiques. C'est ainsi que j'ai voulu orienter ma thèse sur le versant médical de notre profession et j'avoue avoir été encouragé par mes proches et en particulier par un ami (H.M) qui m'a inspiré l'idée d'une « dent connectée ».

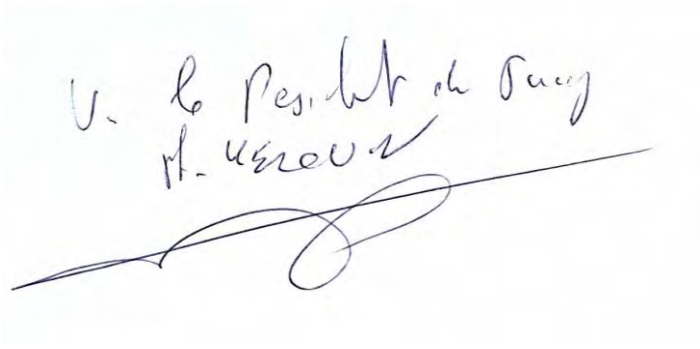
Au cours de cette thèse, nous avons montré que l'utilisation de biomarqueurs et de biocapteurs dans la salive est en plein essor mais en reste à ses prémisses. C'est donc un sujet prometteur et innovant que je souhaite continuer en Master de Biologie.

Notre étude pilote a montré l'intérêt du microbiote salivaire comme un biomarqueur de la glycémie sanguine. De plus, nous nous sommes interrogés sur le rôle des changements dans le microbiote salivaire constatés et de leurs implications dans la survenue des pathologies systémiques. Cette étude ouvre des pistes sur la validation de ces cibles que nous espérons pouvoir tester sur une nouvelle cohorte de patients diabétiques et cela dans un futur proche.

Ce travail m'a permis de découvrir le monde de la recherche odontologique en lien avec la santé générale au travers une étude clinique pilote.

Je suis donc très enthousiaste de ma première participation dans une équipe de recherche. Je remercie tous ceux à l'INSERM Equipe 2 qui m'ont aidé, et en particulier le Dr. Vincent Blasco-Baque à qui je dois toute cette initiation. J'espère que cette thèse sera le début d'un « bout de chemin » ensemble dans le monde de la recherche et que je pourrai continuer ce projet dans un futur proche, à travers un Master et une thèse en Biologie.





ANNEXES

QUESTIONNAIRE

Partie 1 : ORDRE GENERAL :

- Date de naissance : .../.../.....

- Pays de naissance : ……. Nationalité : ……..

- Sexe : Femme ☐ ou Homme ☐

- Quel est votre niveau d'étude ?

Primaire ☐ Collège/CAP/BEP ☐ Lycée ☐ Bac ☐ Bac+1à+3 ☐ Bac ≥+4

- Quel sport pratiquez- vous : …….

- Fumez-vous ? Oui ☐ Non ☐

Si oui depuis combien de temps : …….

Et combien de cigarettes par jour : …….

- Présentez-vous des allergies ? Oui ☐ Non ☐

Si oui, lesquelles :
……
……
……

- Quel est votre taille (cm) :……. Et votre poids (kg) :……..

- Quel est la date de votre dernière visite chez le Chirurgien-dentiste ? …….

- Raison de cette visite :

- Bénéficiez-vous d'une mutuelle complémentaire : Oui ☐ Non ☐

Partie 2 : SANTE BUCCO-DENTAIRE :

- Quel est votre fréquence de brossage des dents :

Jamais ☐ Tous les mois ☐ Toutes les semaines ☐ Une fois par jour ☐

Au moins deux fois par jour ☐ Au moins trois fois par jour ☐

- Combien de temps vous brossez vous les dents :

Moins de 30 secondes ☐ Entre 30 secondes et 1 minute ☐ Entre 1 minute et 2 minutes ☐

Plus de 2 minutes ☐

- Quel(s) moment(s) de la journée ?

Matin ☐ Midi ☐ Soir ☐ Aléatoire ☐

- Quel type de brosse à dent ?

Plutôt souple ☐ Rigide ☐ Electrique ☐

- Décrivez le mode de brossage ?

……
……

- Quel est votre fréquence d'utilisation du fil dentaire :

Jamais ☐ Tous les mois ☐ Toutes les semaines ☐ Une fois par jour ☐

Au moins deux fois par jour ☐

- Quel est votre fréquence d'utilisation du bain de bouche :

Jamais ☐ Tous les mois ☐ Toutes les semaines ☐ Une fois par jour ☐

Au moins deux fois par jour ☐

Si oui quel produit utilisez-vous ?

- Quel est votre fréquence d'utilisation des brossettes inter-dentaires :

Jamais ☐ Tous les mois ☐ Toutes les semaines ☐ Une fois par jour ☐

Au moins deux fois par jour ☐

- Quelle est en moyenne votre fréquence de consultation chez le chirurgien-dentiste ?

Moins d'une fois tous les deux ans ☐ 1 fois tous les 2ans ☐ 1 fois par an ☐

Au moins 2 fois par an ☐

- Allez-vous chez le dentiste alors que vous n'avez pas mal (simple visite de contrôle) ?

Oui ☐ Non ☐

- Etes- vous à l'aise lorsque vous êtes assis sur le fauteuil dentaire ou dans la salle d'attente ?

Oui ☐ Non ☐

Sur une échelle de 1 à 10, à combien chiffreriez-vous votre anxiété ?

- Vous sentez vous assez informé sur les mesures d'hygiène bucco-dentaire ?

Oui ☐ Non ☐

- En dehors de cette visite avez-vous reçu des informations concernant la santé bucco-dentaire

Chez le sportif de haut niveau ? Oui ☐ Non ☐

Si oui par quelles voies,

Médecin ☐ Dentiste ☐ Média ☐ Caisse d'Assurance Maladie ☐ Mutuelle ☐

Famille/Amis ☐ Autres ☐ (précisez) :……

- Pour vous, c'est important d'avoir une bonne hygiène bucco-dentaire ? Oui ☐ Non ☐

Pourquoi ?……
……
……

<u>Partie 3 : REGIME ALIMENTAIRE</u>

- Dans une journée, combien de repas faites-vous ?

- Prenez vous des compléments alimentaires ou vitaminés ? oui-non

Et si oui lesquels :

- Prenez vous des compléments énergétiques (boissons, barre..) ? oui – non

Et si oui lesquels :

- Combien de collations ? De quel type ?

- Quelle est la durée d'un repas ?
- Avez-vous essayé de perdre du poids récemment ? oui-non

Si oui, dans quel but ?

- Quelle est votre boisson préférée ? a quel moment de la journée buvez vous et en quelle quantité ? Matin, midi et soir ?

- Combien de fois par semaine mangez-vous ?

-Des produits laitiers

-Fromage

-De la viande ou poisson ou œufs ou jambon

-Des légumes

-Des fruits frais

- Combien de fois par semaine mangez-vous ?

-de la charcuterie

-des frites ou fritures

-des gratins

-une pizza

-une quiche

-des plats en sauce

-des pâtisseries et ou glaces

-du chocolat en barre ou tablette

-des gâteaux secs ou biscuits apéritifs

-dans un fast food et quel type ?

- Combien de fois par semaine buvez-vous ?

-de jus de fruits et quel type ?

-des sodas et quel type ?

-de l’alcool et quel type ?

Partie 4 : ALIMENTATION JOUR J ET VEILLE:

- Quels sont vos derniers repas sur les 2 derniers jours ? Quelle quantité et à quelle heure ?

  - Jour 1 : Dimanche 14/05

Petit déjeuner :

Matinée :

Déjeuner :

Après- midi :

Dîner :

  - Jour 2 : Lundi 15/05

Petit déjeuner : NEANT

Matinée : Petit déjeuner offert par la maison

Déjeuner :

Sujet N°	Sexe	Age	Taille / cm	Poids / Kg	UFC/mL	Fumeur	Sportif	Hygiène Bucco-Dentaire		Fréquence de consultation chez dentiste		Stress sur une échelle de 1 à 10	Nbre de repas par jour	Compléments alimentaire	Nbre collations / jour
								Nbre de fois par jour	Temps de brossage en min	par an	Motifs				
1	H	25	180	69	207	non	oui	2	2	0,5	Ctrl*	1	3	0	1
2	H	23	176	70	127	non	oui	2	1,5	1	Ctrl	2	3	0	1,5
3	F	22	166	63	295	oui	oui	2	2	1	Ctrl	2	3,5	0	1
4	H	25	189	94	300	non	oui	2	2	0,5	Ctrl	1	4	0	1
5	H	23	173	64	600	non	oui	2	2	0,5	Dtt*	1	3	0	0
6	H	22	174	86	600	non	oui	2	1,5	0,25	Trauma*	2	3	0	0
7	F	23	163	51	125	non	oui	2	2	1	Dtt	1	3	0	1
8	F	23	173	56	299	oui	oui	3	2	1	Ctrl	7	3	0	1
9	H	25	177	70	600	oui	oui	2	1,5	1	Ctrl	1	3	0	1
10	H	24	168	60	600	non	oui	2	2	1	Ctrl	1	3	0	0
11	F	25	168	60	125	non	oui	3	2	2	Ctrl	2	3	0	0
12	F	23	168	52	583	non	non	2,5	2	2	Dtt	7	3,5	0	0,5
13	F	22	162	51	450	non	non	2	2	1	Dtt	3	3,5	0	1
14	F	25	155	50	600	non	oui	2	2	2	Gingivite	1	2,5	0	1
15	F	23	167	54	571	non	oui	2	2	1	Ortho*	4	2,5	0	0
16	F	32	160	46	583	non	oui	2	2	0,5	Ctrl	3	2,5	1	0
17	F	23	158	49	450	oui	oui	2	2	1	Ctrl	3	4	0	1
18	H	23	185	69	600	non	oui	3	2	0,5	Ctrl	1	4	0	1
19	H	23	180	69	600	non	oui	2	1,5	0,5	Ctrl	1	3	2	1
20	F	23	167	52	600	oui	oui	3	2	0,5	Dtt	3	2	1	0
21	F	25	160	52	309	oui	oui	2	0,75	2	Dtt	2	3	0	2

***Légendes** : Unité formant Colonie (UFC), Homme (H), Femme (F), Contrôle (Ctrl), Détartrage (Dtt), Traumatisme (Trauma), Orthodontie (Ortho)*

***Tableau 8** : Réponses aux questions d'ordre général et d'hygiène buccale*

Nombre de fois par semaine																					
Sujet N°	Produits laitiers	Fromages	Viandes / Poissons	Féculents	Légumes	Fruits frais	Charcuterie	Fritures	Gratins	Pizza	Quiche	Plats en sauce	Pâtisseries / glaces	Chocolat	Biscuits secs	Gâteaux apéritifs	Fast food	Jus fruit	Sodas	Alcools	
																				Forts	Vin
1	7	3	7	6	9	3	6	3	2	2	1	1	0	0	0	5	1	7	2	2	2
2	6	3	7	8	7	5	2	2	1	1	0,5	0,5	1	0	1	3	1	4	6	2	1
3	7	2	7	7	7	7	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0	4,5	2	1	1	2	2	2
4	14	21	15	28	14	14	4	1	4	0,5	0	1,5	1	0	4	1	1	7	1	1	0
5	2	7,5	10	10	10	14	2	0,5	0	1	0,5	0,25	0	0	0	1	0,25	1	1	1	
6	9	2	12	17	11	6	5	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	8	2	2	2
7	7	1	14	14	14	21	1	1	3	0,5	1	1	1	2	0	0,5	0,25	2	0	1	1
8	7	3	10	14	10	7	1	0,25	1	0,5	1	1	0	0	0	1	0,25	7	0	0	2
9	2	7	3	5	1	2	7	3	1	3	0	1	2	0	0	2	1	1	1	0	3
10	7	0	7	7	7	7	0	0,25	0	0	1	1	0	0	1	0,25	0,25	7	0	0	0
11	7,5	4	12,5	7,5	12,5	12,5	7,5	0,25	2	0,25	0,25	7,5	0	0	0	1	1	0	1,5	1	1
12	7	10	10	10	10	14	1	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	2	1	0,5	7	0,5	0,5	0,5
13	14	3	7	7	7	7	1	1	1	0,25	0,25	1	0,25	0,25	7	0,25	0,25	3	0,5	0,5	0,5
14	14	1	7	14	14	7	1	0	2	1	1	1	1	0	3	1	1	7	0	2	0
15	7	2,5	7	7	7	7	0,5	0,5	1	1	1	3,5	2	0	0	0	0	2	0	2	2
16	3	2	10	7	7	3	2	1	2	1	0,5	1	0,5	0	1	1	1	4,5	0	3,5	3,5
17	7	0,25	4,5	7	7	7	0,25	2,5	0,25	1	1	2,5	0,25	7	0,25	0,25	1	7	0,5	2,5	2,5
18	21	7	14	21	7	1	4	1	4	0,5	0,5	0,5	3	6	7	0	0,25	7	3,5	0,75	0,75
19	5	0	14	14	10	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0,5	0,5
20	7	7	3,5	7	7	7	1	2	0	1	2	7	2,5	0	7	0	0	7	0	0	5
21	5	3	3	3	6	3	2	1	2	1	1	1	1	0	1	2	1	5	1	2	0

Tableau 9 *: Réponses aux questions des habitudes alimentaires*

PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN SALIVAIRE

Extraction d'ADN salivaire :

1. Conserver les échantillons au congélateur,
2. Prélever un nombre d'échantillons (par exemple 12/24), laisser décongeler lentement (dans de la glace pillée).
3. Centrifuger à 4°C pendant 5min à 14000 rpm.
4. Mettre le kit d'extraction d'ADN à température ambiante.
5. Eliminer complétement le surnageant à la pipette, ne pas toucher le culot.
6. Ajouter de **200µL de PBS**. Resuspendre le culot au vortex.
7. Préparation de la solution de VXL/Carrier DNA : Dilution au 1000ième, Prélever dans un tube de 5mL, 2mL de la Solution de VXL, 2µL de Carrier DNA à 1µg/µL, conservé à -20°C. Mélanger au vortex
8. Ajouter à chaque échantillon **100µL de la solution VXL/Carrier RNA** préparée. Fermer les tubes, pour assurer un bon mélange, passer rapidement au vortex et microfuger 15secondes (pour tout récupérer au fond des tubes).
9. Ajouter **20µL de protéinase K**.
10. Passer au Vortex afin d'assurer un bon mélange dans les échantillons pour resuspendre les culots.
11. -Incuber **15min à 25°C** dans un bain à **SEC**.
12. Ajouter **350µL de la solution ACB**, puis vortexer et microcentrifuger.
13. Disposer le même nombre de colonnes d'extraction que d'échantillons.
14. Déposer sur chaque colonne le contenu des échantillons (environ 700µL).
15. Centrifuger 2min à 12000 rpm.
16. Eliminer les tubes avec leur contenu.
17. Ne Transférer que les filtres des colonnes dans des tubes collecteurs, pour pouvoir laver les colonnes à l'Ethanol.
18. Ajouter **600µL d'éthanol AW1**.
19. Centrifuger 3min à 12000 rpm.
20. Ajouter **600 µL d'éthanol AW2**, centrifuger de nouveau 3min à 12000rpm.
21. Pour sécher la colonne et éliminer les traces d'éthanol, centrifuger 5min à 20000 rpm.
22. Prendre des tubes collecteur de 1,5 ml, reporter la numérotation de chacun des échantillons sur les tubes collecteurs, positionner les colonnes sur ces tubes.
23. Pour extraire l'ADN, ajouter sur les colonnes **50µL de la solution AVE**.
24. Laisser agir 2 min (pas plus) le temps que le filtre se lave à température ambiante.
25. Récupérer l'ADN des échantillons en centrifugeant 2min à 20000rpm.
26. Utilisation du Nanodrop pour la détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN préparé.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-après.

Echantillon base	Acide Nucléique ng/µL	Densité Optique 260/280
1a	110,1	1,98
2a	134,9	1,94
3a	128	1,89
4a	82,9	1,88
5a	112,6	1,93
6a	82,5	1,97
7a	10,3	1,63
8a	139,6	1,94
9a	60,1	1,96
10a	130	1,9
11a	55,3	1,99
12a	176,7	1,91
13a	87,6	1,96
14a	84,4	1,99
15a	103,6	1,93
16a	62,8	1,94
17a	98,5	1,96
18a	92,2	1,87
19a	88,3	2
21a	41,8	2,07
1n	118,4	2,02
2n	100,3	1,97
3n	100,9	1,93
4n	74,4	1,95
5n	92,9	2,04
6n	79,9	1,93
7n	107,5	1,93
8n	112,6	1,97
11n	47,5	2,1
9n	77,9	1,97
10n	82,1	1,95
12n	100,6	2,03
13n	50,4	1,97
14n	53,3	2,08
15n	159	1,97
16n	98,6	1,99
17n	88,6	2,01
18n	87,9	2,07
19n	111,1	1,97
21n	92,6	1,98

Tableau 10 *: Concentration des ADN ng/µL de nos échantillons salivaires*

BIBLIOGRAPHIE

1. **Langley, J. N.** On the Changes in Serous Glands during Secretion. *The Journal of Physiology.* 1879, Vol. 2, pp. 261–322.

2. **Edgar, WM.** Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J.* 1992, Vols. Apr 25;172(8):305-12.

3. **Carpenter, GH.** The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2013, Vol. 4, pp. 267-276.

4. **Herrera, JL. Lyons, MF. Johnson, LF.** Saliva: its role in health and disease. Oct;10(5):569-78. *J Clin Gastroenterol.* Oct 10, 1988, pp. 569-78.

5. **Devoize, L., Dallel, R.** *Salivation.* Paris : EMC (Elsevier Masson SAS), 2010. Vols. Médecine buccale, 28-150-M-10.

6. **Mandel, ID.** The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc.* 1989, Vol. 119, pp. 298-304.

7. **Dawes, C.** Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc.* 2008, 139, pp. 18-20.

8. **Epstein JB, Gorsky M, Guglietta A, Le N, Sonis ST.** The correlation between epidermaThe correlation between epidermal growth factor levels in saliva and the severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. , 2000, 89, Il, 2258-2265. *Cancer.* 2000, Vol. 89, pp. 2258-2265.

9. **Zhang, C.-Z., Cheng, X.-Q., Li, J.-Y., Zhang, P., Yi, P., Xu, X., & Zhou, X.-D.** Saliva in the diagnosis of diseases., 133–137. *International Journal of Oral Science.* 2016, Vols. 8(3),, pp. 133-137.

10. **Kaczor-Urbanowicz, KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT.** Saliva diagnostics. *Exp Biol Med (Maywood).* Mar 2017, Vol. 242, 5, pp. 459-472.

11. **Denny, PC. Denny, PA. Takashima, J. Si, Y. Navazesh, M. Galligan, JM.** A novel saliva test for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc.* 2006, Vols. 34:287-90, pp. 292-294.

12. **Bence Jones, H.** On a new substance occuring in the urine with mollities ossium . *Phil Trans R Soc Lond.* 1848, Vol. 138, pp. 55-62.

13. **Kew, M.** Alpha-fetoprotein in primary liver cancer and other diseases. *Gut.* 1974, Vol. 15, pp. 814-821.

14. **Bell, H.** Alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in patients with primary liver carcinoma, metastatic liver disease, and alcoholic liver disease.. 17, 897-903. *Scand J Gastroenterol.* 1982, Vol. 17, pp. 897-903.

15. **Jacobs, I. Oram, D. Fairbanks, J. Turner, J. Frost, C. Grudzinskas, JG.** A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer.. 97:922-9. *Br J Obstet Gynaecol.* 1990, Vol. 97, pp. 922-929.

16. **Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr.** Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *New England Journal of Medicine.* 2004, Vol. 350, pp. 2239-2246.

17. **Scheibenbogen, C. Freitag, H. Blanco, J. Capelli, E. Lacerda, E. Authier, J. Murovska, M.** The European ME/CFS Biomarker Landscape project: an initiative of the European network EUROMENE. *Journal of Translational Medicine.* 2017, Vol. 15, p. 162.

18. **Frisoni, G. B. et al.** Strategic roadmap for an early diagnosis of Alzheimer's disease based on biomarkers. *The Lancet Neurology.* 2017, Vol. 16, 8, pp. 661-676.

19. **Danese, E., & Montagnana, M.** An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Annals of Translational Medicine.* 2016, Vol. 4, 10, p. 194.

20. **Papa, L., Ramia, M. M., Edwards, D., Johnson, B. D., & Slobounov, S. M.** Systematic Review of Clinical Studies Examining Biomarkers of Brain Injury in Athletes after Sports-Related Concussion. *Journal of Neurotrauma,.* 2015, Vol. 32, 10, pp. 661-673.

21. **Cannistrà M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, Naso A, Grande R, Serra R, Nardo B.** Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *Int J Surg.* Sep 2016, Vol. 33, Suppl 1, pp. S57-70.

22. **Yan, W. Apweiler.R. Balgley,B.M. Boontheung,P. Bundy,J.L. Cargile,B.J. Cole,S. Fang,X. Gonzalez-Begne,M. Griffin,T.J. Hagen F, Hu S, Wolinsky,L.E. & al.** Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clin Appl.* Than S, Yates JR, Yu W, Xie H, Xie Y, Omenn GS, Loo JA, Wong DT, 2009, Vol. 3, 1, pp. 116-134.

23. **Tatsuta, M. Itoh,T. Okuda,S. Yamamura,H. Baba,M. Tamura,H.** Carcinoembryonic antigen in gastric juice as an aid in diagnosis of early gastric cancer Dec 15;46(12):2686-92. *Cancer.* 1980, Vol. 46, 12, pp. 2686-2692.

24. **Gold, P. Shuster,J. Freedman,SO.** Carcinoembryonic antigen (CEA) in clinical medicine: historical perspectives, pitfalls and projections. *Cancer.* 1978, Vol. 42, 3 suppl., pp. 1399-1405.

25. **Jou, YJ. Lin,CD. Lai,CH. Huang,SH. Tsai,MH. Chen,SY. Kao,JY. Lin,CW.** Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages. *Clin Chim Acta.* Jul 15 2011, Vol. 412, 15-16, pp. 1357-1365.

26. **Lehmann, S1. Delaby,C. Touchon,J. Hirtz,C. Gabelle, A.** A Biomarkers of Alzheimer's disease: the present and the future. *Rev Neurol.* 2013, Vol. 169, 10, pp. 719-723.

27. **Etzel, RA.** A review of the use of saliva cotinine as a marker of tobacco smoke exposure. *Prev Med.* 1990 ar, Vol. 19, 2, pp. 190-197.

28. **Marsot, A. Audebert,C. Attolini,L. Lacarelle,B. Micallef,J. Blin,O.** Comparison of Cannabinoid Concentrations in Plasma, Oral Fluid and Urine in Occasional Cannabis Smokers After Smoking Cannabis Cigarette. *J Pharm Pharm Sci.* 2016, Vol. 19, pp. 411-422.

29. **Cossart, P.** *La Nouvelle Microbiologie : Des microbiotes aux CRISPR.* s.l. : Editions Odile Jacob.

30. **Nicolas, S. Blasco-Baque,V. Fournel,A. Gilleron,J. Klopp,P. Waget,A. Ceppo,F. Marlin,A. Padmanabhan,R. Iacovoni,J.S. ... Matteo Serino,M.** Transfer of dysbiotic gut microbiota has beneficial effects on host liver metabolism. *Mol Syst Biol.* 2017, Vol. 13, 3, p. 921.

31. **Claesson, MJ. Clooney,AG. O'Toole,PW.** A clinician's guide to microbiome analysis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Aug 9.

32. **Bajaj, JS. Betrapally,NS. Hylemon,PB. Heuman,DM. Daita,K. White,MB. Unser,A. Thacker,LR. Sanyal,AJ. Kang,DJ. Sikaroodi,M. Gillevet,PM.** Salivary microbiota reflects changes in gut microbiota in cirrhosis with hepatic encephalopathy. . *Hepatology.* 2015, Vol. 62, pp. 1260-1271.

33. **McLean, JS. Liu,Q. Bor,B. Bedree,JK. Cen,L. Watling,M. … Shi,W.** Draft Genome Sequence of Actinomyces odontolyticus subsp. actinosynbacter Strain XH001, the Basibiont of an Oral TM7 Epibiont. *Genome Announcements,.* 2016, Vol. 4, 1, pp. 1685-1715.

34. **Baulande, S. Criqui,A. Duthieuw,M.** Baulande S., Criqui A., Duthieuw M. (Les microARN circulants, une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. Med Sci (Paris) 30 : 289–296. *Med Sci.* 2014, Vol. 30, pp. 289-296.

35. **Gilad, S. Meiri,E. Yogev,Y. Benjamin,S. Lebanony,D. Yerushalmi,N. … Chajut,A. PLoS ONE.** Serum MicroRNAs Are Promising Novel Biomarkers. 2008, Vol. 3, 9, p. 3148.

36. **El-Ansary, A. Bjørklund,G. Chirumbolo,S. Alnakhli,OM.** Predictive value of selected biomarkers related to metabolism and oxidative stress in children with autism spectrum disorder. *Metab Brain Dis.* 2017 Aug, Vol. 32, 4, pp. 1209-1221.

37. **Ong, ILH. Yang,KL.** Recent developments in protease activity assays and sensors. *Analyst.* 2017 May 30, Vol. 142, 11, pp. 1867-1881.

38. **O'Farrell, PZ. Goodman,HM. O'Farrell,PH.** High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell 1133-41. *Cell.* 1977 Dec, Vol. 12, 4, pp. 1133-1141.

39. **Han, X. Aslanian,A. Yates, JR.** Mass Spectrometry for Proteomics. Current Opinion in Chemical Biology. 2008, Vol. 12, 5, pp. 483–490.

40. **Cabras, T. Iavarone,F. Manconi,B. Olianas,A. Sanna,MT. Castagnola,M. Messana, I.** Top-down analytical platforms for the characterization of the human salivary proteome. *Bioanalysis.* 2014, Vol. 6, pp. 563-581.

41. **Marshall, DD. Powers,R.** Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2017 May, Vol. 100, pp. 1-16.

42. **Pant Pai, N. Balram,B. Shivkumar,S. Martinez-Cajas,JL. Claessens,C. Lambert,G. Peeling,RW. Joseph,L.** Head-to-head comparison of accuracy of a rapid point-of-care HIV test with oral versus whole-blood specimens: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases.* 2012, Vol. 12, 5, pp. 373 – 380.

43. **Luque de Castro, MD. Priego-Capote,F.** The analytical process to search for metabolomics biomarkers. . 2017 Jul 6. *J Pharm Biomed Anal.* 2017 jul 6, Vol. 7085, 17, pp. 31550-31559.

44. **Mullis, K. Faloona,F. Scharf,S. Saiki,R. Horn,G. Erlich, H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986, Vol. 51, 1, pp. 263-73.

45. **Kappel, A. Keller,A.** miRNA assays in the clinical laboratory: workflow, detection technologies and automation aspects. *Clin Chem Lab Med.* 2017, Vol. 55, pp. 637-647.

46. **Taverniti, V. Guglielmetti,S.** Methodological issues in the study of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome 8821-36. *World J Gastroenterol.* 2014, Vol. 20, pp. 8821-8836.

47. **Rescigno, M.** The microbiota revolution: Excitement and caution. *Eur J Immunol.* 2017 Jul, Vol. 10, p. 1002.

48. **Prasad, S. Tyagi,AK. Aggarwal, BB.** Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. 783–799. *Experimental Biology and Medicine.* 2016, Vol. 241, 8, pp. 783-799.

49. **Owens, M. Herbert,J. Jones,P.B. Sahakian,B.J., Wilkinson,P.O. Dunn,V.J., … Goodyer,I.M.** Elevated morning cortisol is a stratified population-level biomarker for major depression in boys only with high depressive symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014, Vol. 111, 9, pp. 3638-3643.

50. **Yakob, M. Fuentes,L. Wang,M.B. Abemayor,E. Wong,D.T.W.** Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma – current state and recent advances. *Current Oral Health Reports.* 2014, Vol. 1, 2, pp. 133–141.

51. **Bachmann, LM. Puhan,MA. ter Riet,G. Bossuyt,PM.** Sample sizes of studies on diagnostic accuracy: literature survey. *BMJ.* 2006, Vol. 332, pp. 1127-9.

52. **Wang, Q. Gao,P. Cheng,F. Wang,X. Duan,Y.** Wang Q, Gao P, Cheng F, Wang X, Duan Y Measurement of salivary metabolite biomarkers for early monitoring of oral cancer with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta.* 2014, Vol. 119, pp. 299-305.

53. **Blasco-Baque, V.** *Relation moléculaire bi-directionnelle entre diabète et maladie parodontale.* Université Toulouse III Paul Sabatier. 2013. Thèse.

54. **Petersen, PE. Ogawa,H.** The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000.* 2012, Vol. 60, pp. 15-39.

55. **Listl, S. Galloway,J. Mossey,PA. Marcenes, W.** Global Economic Impact of Dental Diseases. *J. Dent Res.* 2015, Vol. 94, 10, pp. 1355-1361.

56. **Vitorino, R. Calheiros-Lobo,MJ. Duarte,JA. Domingues,P. Amado,F.** Salivary clinical data and dental caries susceptibility: is there a relationship? *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 2006, Vol. 47, 1, pp. 27-33.

57. **Gursoy, U.K. Könönen,E. Pussinen,P.J. Tervahartiala,T. Hyvärinen,K. Suominen, A.L. Sorsa,T.** Use of Host- and Bacteria-Derived Salivary Markers in Detection of Periodontitis: A Cumulative Approach. *Disease Markers.* 2011, Vol. 30, 6, pp. 299–305.

58. **Sorsa, T. Gursoy,UK. Nwhator,S. Hernandez,M. Tervahartiala,T. Leppilahti,J. Gursoy,M. Könönen,E. Emingil,G. Pussinen,PJ. Mäntylä,P.** Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival creviclular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2016, Vol. 70, pp. 142-163.

59. **Isaza-Guzmán, DM1. Medina-Piedrahíta,VM1. Gutiérrez-Henao,C1. Tobón-Arroyave,SI1.** Salivary Levels of NLRP3 Inflammasome-Related Proteins as Potential Biomarkers of Periodontal Clinical Status . *J Periodontol.* 2017, Vol. 10, pp. 1-13.

60. **Sakanaka, A. Kuboniwa,M. Hashino,E. Bamba,T. Fukusaki,E. Amano,A.** Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status. *Scientific Reports.* 2017, Vol. 7, p. 42818.

61. **Bregy, L. Müggler,A.R. Martinez-Lozano Sinues,P. García-Gómez,D. Suter,Y. Belibasakis,G.N. Zenobi,R.** Differentiation of oral bacteria in in vitro cultures and human saliva by secondary electrospray ionization – mass spectrometry. *Scientific Reports.* 2015, Vol. 5, p. 15163.

62. **Schmalz, G. Li,S. Burkhardt, R., Rinke, S., Krause, F., Haak, R., & Ziebolz, D.** MicroRNAs as Salivary Markers for Periodontal Diseases: A New Diagnostic Approach? 1027525. *BioMed Research International.* 2016.

63. **Wignarajah, S. Suaifan,G.A.R.Y. Bizzarro,S. Bikker,F.J. Kaman,W.E. Zourob,M.** Colorimetric Assay for the Detection of Typical Biomarkers for Periodontitis Using a Magnetic Nanoparticle Biosensor. *Analytical Chemistry.* 2015, Vol. 87, pp. 12161-12168 .

64. **Cheng, YL. Jordan,L. Chen,HS. Kang,D. Oxford,L. Plemons,J. Parks,H. Rees,T.** Chronic periodontitis can affect the levels of potential oral cancer salivary mRNA biomarkers. *J Periodontal Res.* 2017, Vol. 52, pp. 428-437.

65. **Yu, J.S. Chen,Y.T. Chiang,W.F. Hsiao,Y.C. Chu,L.J. See,L.C. Hartwell,L.H.** Saliva protein biomarkers to detect oral squamous cell carcinoma in a high-risk population in Taiwan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2016, Vol. 113, 41, pp. 11549-11554.

66. **Kawahara, R. Bollinger,J.G. Rivera,C. Ribeiro,A.C.P. Brandão,T.B. Paes Leme,A.F. MacCoss,M.J.** A targeted proteomic strategy for the measurement of oral cancer candidate biomarkers in human saliva. *Proteomics.* 2016, Vol. 16, 1, pp. 159–173.

67. **Momen-Heravi, F. Trachtenberg,A.J. Kuo,W.P. Cheng, Y. S.** Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer. *Journal of Dental Research.* 2014, Vol. 93, 7 suppl, pp. 86S–93S.

68. **Wei, F. Lin,C.C. Joon,A. Feng,Z. Troche,G. Lira,M.E. … Wong,D.T.W.** Noninvasive Saliva-based EGFR Gene Mutation Detection in Patients with Lung Cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2014, Vol. 190, 10, pp. 1117–1126.

69. **Csősz, É. Lábiscsák,P. Kalló,G. Márkus,B. Emri,M. Szabó, A., … Márton, I.** Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers. *PLoS ONE.* 2017, Vol. 12, 5, p. 177282.

70. **Du, Y. Zhang,W. Wang,M.L.** An On-Chip Disposable Salivary Glucose Sensor for Diabetes Control. *Journal of Diabetes Science and Technology.* 2016, Vol. 10, 6, pp. 1344–1352.

71. **Liu, C1. Sheng,Y1. Sun,1. Feng,J1. Wang,S1. Zhang,J2. Xu,J3. Jiang,D.** A glucose oxidase-coupled DNAzyme sensor for glucose detection in tears and saliva. *Biosens Bioelectron.* 2015, Vol. 70, pp. 455-461.

72. **Dhanya, M. Hegde,S.** Salivary glucose as a diagnostic tool in Type II diabetes mellitus: A case-control study. *Niger J Clin Pract.* 2016, Vol. 19, pp. 486-490.

73. **Kadashetti, V. Baad,R. Malik,N. Shivakumar,KM. Vibhute,N. Belgaumi,U. Gugawad,S. Pramod,RC. Rom,J.** Glucose Level Estimation in Diabetes Mellitus By Saliva: A Bloodless Revolution Rom (. *J Intern Med.* 2015 Jul-Sep, Vol. 53, 3, pp. 248-252.

74. **Carramolino-Cuéllar E, Lauritano,D. Carinci,F. Silvestre-Rangil,J and Bañuls-Morant, C. Silvestre,FJ. Hernández-Mijares,A.** Salivary glucose as a metabolic control marker in patients with type 2 diabetes). *J Biol Regul Homeost Agents.* 2017, Vol. 31, pp. 181-187.

75. **Naing, C. Mak,JW.** Salivary glucose in monitoring glycaemia in patients with type 1 diabetes mellitus: a systematic review. *J Diabetes Metab Disord.* 2017, Vol. 16, 2.

76. **Rao, PV. Reddy,AP. Lu,X. Dasari,S. Krishnaprasad,A. Biggs,E. Roberts,CT. Nagalla,SR.** Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *Proteome Res.* 2009, Vol. 8, pp. 239-245.

77. **Barnes, V.M. Kennedy,A.D. Panagakos,F. Devizio,W. Trivedi,H.M. Jönsson,T. … Scannapieco,F.A.** Global Metabolomic Analysis of Human Saliva and Plasma from Healthy and Diabetic Subjects, with and without Periodontal Disease. ,. *PLoS ONE.* 2014, Vol. 9, 8.

78. **Rao, PV. Laurie,A. Bean,ES. Roberts,CT.Jr Nagalla,SR.** Salivary protein glycosylation as a noninvasive biomarker for assessment of glycémie. *J Diabetes Sci Technol.* 2015, Vol. 9, pp. 97-104.

79. **Chung, T. Hsu,K. Chen,J. Liu,J. Chang,H. Li,P., … Lee,C.** Association of salivary alpha 2-macroglobulin levels and clinical characteristics in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation.* 2016, Vol. 7, 2, pp. 190-196.

80. **Lee, Y.H. Joshipura,K. Luis Vergara,J. Wong D.** Detection of type II diabetes mellitus using salivary transcriptomic biomarkers. Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences. 2012, Vol. 10, p. 1016.

81. **Seethalakshmi, C. Reddy,R.C.J. Asifa,N. Prabhu,S.** Correlation of Salivary pH, Incidence of Dental Caries and Periodontal Status in Diabetes Mellitus Patients: A Cross-sectional Study. , 1. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR.* 2016, Vol. 10, 3, pp. ZC12-ZC14.

82. **Patel, S. Nanda,R. Sahoo,S. Mohapatra,E.** Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis., 2016, 3130469. *Biochemistry Research International.* 2016.

83. **Bhalla, N. Jolly,P. Formisano,N. Estrela,P.** Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry.* 2016, Vol. 60, 1, pp. 1-8.

84. **Mishra, S. Saadat,D. Kwon,O. Lee,Y. Choi,WS. Kim,JH. Yeo,WH.** Recent advances in salivary cancer diagnostics enabled by biosensors and bioelectronics. *Biosens Bioelectron.* Jul 15, 2016, Vol. 81, pp. 181-197.

85. **Lakshmi, K.R. Nelakurthi,H. Kumar,A.S. Rudraraju,A.** Oral fluid-based biosensors: A novel method for rapid and noninvasive diagnosis. : 60-66. *Indian J. of Dental Sciences.* 2017, Vol. 9, 1, pp. 60-66.

86. **Malon, R.S.P. Sadir,S. Balakrishnan,M. Córcoles,E.P.** Saliva-Based Biosensors: Noninvasive Monitoring Tool for Clinical Diagnostics. *BioMed Research International.* 2014.

87. **Chaplin, M. and Bucke,C.** *Enzyme Technology.* s.l. : Cambridge University Press, 1990. Vols. Chapitre 6, Figure 6.1.

88. **Vidic, J. Pajot-Augy,E.** Nanobiocapteurs olfactifs pour la détection de pathologies. *Techniques de l'Ingénieur.* 2014.

89. **St John, MA. Li,Y. Zhou,X. Denny,P. Ho,CM. Montemagno,C. Shi,W. Qi,F. Wu,B. Sinha,U. Jordan,R. Wolinsky,L. Park,NH. Liu,H. Abemayor,E. Wong,DT.** Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004, Vol. 130, pp. 929-935.

90. **Zhang, Y. Chen,R. Xu,L. Ning,Y. Xie,S. Zhang,GJ.** Silicon nanowire biosensor for highly sensitive and multiplexed detection of oral squamous cell carcinoma biomarkers in saliva). *Anal Sci.* 2015, Vol. 31, pp. 73-78.

91. **Taguchi, M. Ptitsyn,A. McLamore,E.S. Claussen,J.C.** Nanomaterial-mediated Biosensors for Monitoring Glucose. *Journal of Diabetes Science and Technology.* 2014, Vol. 8, 2, pp. 403–411.

92. **Kim, N.Y. Adhikari,K.K. Dhakal,R. Chuluunbaatar,Z. Wang,C. Kim,E.S.** Rapid, Sensitive, and Reusable Detection of Glucose by a Robust Radiofrequency Integrated Passive Device Biosensor Chip. ,. *Scientific Reports.* 2015, Vol. 5, p. 7807.

93. **Du, X. Li,Y. Herman,GS.** A field effect glucose sensor with a nanostructured amorphous In-Ga-Zn-O network. *Nanoscale.* 2016, Vol. 8, pp. 18469-18475.

94. **Yao, H. Shum,A.J. Cowan,M. Lähdesmäki,I. Parviz,B.A.** A contact lens with embedded sensor for monitoring tear glucose level. *Biosensors & Bioelectronics.* 2011, Vol. 26, 7, pp. 3290–3296.

95. **Bergey, D.H.** *Bergey's Manual of determinative Bacteriology .* s.l. : David Hendricks Bergey, 1932-2012.

96. **Jurysta, C. Bulur,N. Oguzhan,B. Satman,I. Yilmaz,T.Y. Malaisse,W.J. Sener,A.** Salivary Glucose Concentration and Excretion in Normal and Diabetic Subjects. *J Biomed Biotechnol.* 2009, Vol. 10, p. 1155.

97. **Karjalainen, S. Sewón,L. Söderling,E. Larsson,B. Johansson,I. Simell,O. Lapinleimu,H. Seppänen,R.** Salivary cholesterol of healthy adults in relation to serum cholesterol concentration and oral health. *J Dent Res.* 1997, Vol. 76, 10, pp. 637-43.

98. **Kok, N. Roberfroid,M. Delzenne,N.** Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metab. Clin. Exp.* 1996, Vol. 45, pp. 1547–1550.

99. **Wu, G.D. Chen,J. Hoffmann,C. Bittinger,K. Chen,Y.Y. Keilbaugh,S.A. et al.** Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science .* 2011, Vol. 334, pp. 105–108.

100. **Pyra, K.A. Saha,D.C. Reimer,R.A.** Prebiotic fiber increases hepatic acetyl CoA carboxylase phosphorylation and suppresses glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion more effectively when used with metformin in obese rats. 1. *J. Nutr.1.* 2012, Vol. 142, pp. 213-220.

101. **Tucker, R.M. Mattes,R.D. Running,C.A.** Mechanisms and effects of "fat taste" in humans. *Biofactors.* 2014, Vol. 40, pp. 313-326.

102. **Neyraud, E. Cabaret,S. Brignot,H. Chabanet,C. Labouré,H. Guichard,E. Berdeaux,O.** The basal free fatty acid concentration in human saliva is related to salivary lipolytic activity. *Sci Rep.* 2017, Vol. 7, p. 5969.

103. **Palmerini, C.A. Saccardi,C. Ferracci,F. Arienti,S.** Lipid patterns in the saliva of smoking young adults. *Hum Exp Toxicol.* 2011, Vol. 10, pp. 1482-1488.

104. **Hamosh, M. Scow,R.O.** Lingual lipase and its role in the digestionof dietary lipid. *J. Clin. Invest.* 1973, Vol. 52, pp. 88-95.

105. **Robinson, D.S. Speake B.K.** Role of insulin in the control of lipoprotein lipase activity. *Biochem. Soc. Trans.* 1989, Vol. 17, pp. 40-41.

106. **Scannapieco, F.A. Torres,G. Levine,M.J.** Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993, Vol. 4, pp. 301-307.

107. **Subramaniam, P. Sharma,A. Kaje,K.** Association of salivary triglycerides and cholesterol with dental caries in children with type 1 diabetes mellitus . *Spec Care Dentist.* 2015, Vol. 35, 3, pp. 120-122.

108. **Evaldson, G. Heimdahl,A. Kager,L. Nord,C.E.** The normal human anaerobic microflora. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1982, Vol. 35, pp. 9-15.

109. **Goodson, J.M. Hartman,M.L. Shi,P. Hasturk,H. Yaskell,T. Vargas,J. … Behbehani,K.** The salivary microbiome is altered in the presence of a high salivary glucose concentration. *PLoS ONE.* 2017, Vol. 12, 3, pp. 1-20.

110. **Thomas, F. Hehemann,J.H. Rebuffet,E. Czjzek,M. Michel,G.** Environmental and gut bacteroidetes. *Front Microbiol.* 2011, Vol. 2, p. 93.

111. **Ley, R.E. Ba¨ckhed,F. Turnbaugh,P.J. Lozupone,C.A. Knight,R.D. Gordon,J.I.** Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, Vol. 102, pp. 11070–11075.

112. **Gibbons, R.J.** Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res.* 1989, Vol. 68, 5, pp. 750-760.

113. **Luo, A.H. Yang,D.Q. Xin,B.C. Paster,B.J. Qin,J.** Microbial profiles in saliva from children with and without caries in mixed dentition. *Oral Dis.* 2012, Vol. 18, 6, pp. 595-601.

114. **Testa, M. Erbiti,S. Delgado,A. Cardenas,I.L.** Evaluation of oral microbiota in undernourished and eutrophic children using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Anaerobe.* 2016, Vol. 42, pp. 55-59.

115. **Massad-Ivanir, N. Shtenberg,G. Raz,N. Gazenbeek,C. Budding,D. Bos,M.P. Segal,E.** Porous Silicon-Based Biosensors: Towards Real-Time Optical Detection of Target Bacteria in the Food Industry. *Scientific Reports,.* 2016, Vol. 6, p. 38099.

116. **Yoo, M.S. Shin,M. Kim,Y. Jang,M. Choi,Y.E. Park,S.J. Choi,J. Lee,J. Park,C.** Development of electrochemical biosensor for detection of pathogenic microorganism in Asian dust events. *Chemosphere.* 2017, Vol. 175, pp. 269-274.

117. **Ahmed, A. Rushworth,J.V. Hirst,N.A. Millner,P.A.** Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clin. Microbiology reviews.* Vol. 27, pp. 631-646.

118. **Tîlmaciu, C.M. Morris,M.C.** Carbon nanotube biosensors . *Front. Chem.* 2015, p. 59.

119. **Mannoor, M.S. Tao,H. Clayton,J.D. Sengupta, A. Kaplan,D.L. Naik,R.R. Verma,N. Omenetto,F.G. McAlpine,M.C.** Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. *Nature communications.* p. 763.

120. **Chen, X. et al.** Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008, Vol. 18, pp. 997–1006.

121. **Mitchell, P.S. et al.** Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, Vol. 105, pp. 10513–10518.

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1: Anatomie des glandes salivaires 15
Figure 2 : Echanges d'électrolytes entre le fluide interstitiel et l'émail 18
Figure 3 : Nanotechnologies et Médecine : les biomarqueurs (Chad A. Mirkin, North Western University) ... 21
Figure 4 : « Lingual lipase catalytic triad highlighted center » 23
Figure 5 : Du génome au protéome (par Jean Pierre Lavergne VieS des Sciences, SociétéS, ArtS) 25
Figure 6 : Tracé de métabolites 26
Figure 7 : Les différents microbiotes du corps humain 28
Figure 8 : Schéma de la fonction d'un miRNA 29
Figure 9 : Coloration d'une activité enzymatique 30
Figure 10 : Spectromètre de masse 31
Figure 11 : Kits d'analyses 32
Figure 12 : Schéma de l'amplification d'un brin d'ADN 32
Figure 13 : Appareil de PCR 33
Figure 14 : Startups spécialisées dans la connaissance du microbiome 33
Figure 15 : Variation de pH avant et après la mastication d'un "gum" 34
Figure 16 : Différents stades d'une maladie parodontale 37
Figure 17 : La différence entre les deux diabètes 40
Figure 18 : Principe d'un biocapteur 42
Figure 19 : Fonctionnement d'un biocapteur 44
Figure 20 : La K'Watch (1) 45
Figure 21 : Tatouage reflétant sa glycémie 46
Figure 22 : Illustration d'une lentille jetable 46
Figure 23 : Capteur glycémique relié à un smartphone 47
Figure 24 : Principe expliquant l'intérêt de la médecine personnalisée 47
Figure 25 : Diagramme représentant l'intérêt croissant pour les biomarqueurs 48
Figure 26 : Diagramme représentant l'intérêt croissant pour les biocapteurs 49
Figure 27 : Capteur glycémique Performa utilisé pour notre étude 51
Figure 28 : Indicateur de la consommation de sodas des sujets de l'étude 54
Figure 29 : Indicateur de la différence entre les hommes et les femmes : cholestérol, triglycérides 56
Figure 30 : Indicateur de la différence entre les hommes et les femmes : acides gras libres 56
Figure 31 : Comparaison Glycémie sanguine, Lipase sur les sujets à jeun et nourris 58
Figure 32 : Comparaison AGL salivaires sur les sujets à jeun et nourris 58
Figure 33 : Corrélation entre l'activité lipase salivaire et la glycémie sanguine 59
Figure 34 : Analyse en Composantes Principales (PCA) 60
Figure 35 : Nombre de bactéries en fonction de la glycémie sanguine à jeun 61
Figure 36 : Marqueurs de la diversité du microbiote oral entre les hommes et les femmes 62
Figure 37 : Top 15 Genres retrouvés dans les échantillons de notre étude. 63
Figure 38 : Analyse par cladogramme du microbiote des hommes et des femmes 64
Figure 39 : Marqueurs de la diversité du microbiote oral entre des hommes nourris vs à jeun. 65
Figure 40 : Top 15 Genres retrouvés chez les sujets mâles de notre étude 66
Figure 41: Analyse par cladogramme du microbiote des hommes à jeun et nourris 67
Figure 42: Marqueurs de la diversité du microbiote oral des femmes nourries vs à jeun 68
Figure 43: Top 15 Genres retrouvés dans les échantillons femelles de notre étude 69
Figure 44: Analyse par cladogramme du microbiote oral des femmes à jeun et nourries 70
Figure 45 : Indicateur de l'activité lipase à jeun et nourri 71

Figure 46 : Hypothèse de Goodson & al pour expliquer les changements du microbiote salivaire en réponse à des concentrations en glucose élevées 74
Figure 47 : Evolution des biocapteurs dans le temps 75
Figure 48 : Illustration d'un capteur de bactéries sur une dent par Mansoor (119) 75

Tableaux

Tableau 1 : Variation salivaire selon sa composition ionique 16
Tableau 2 : Débit salivaire en fonction de sa stimulation 18
Tableau 3 : Comparaison des paramètres généraux entre hommes et femmes 53
Tableau 4 : Comparaison bilan lipidique salivaire et glycémie sanguine à jeun entre les hommes et les femmes 55
Tableau 5 : Comparaison bilans lipidiques salivaires et glycémie sanguine à jeun et nourri des hommes et des femmes confondus 57
Tableau 6 : Nombre de bactéries comptées dans les échantillons salivaires 61
Tableau 7 : Tableau de Lakshmi sur les biocapteurs salivaires proposés pour le diagnostic de diverses pathologies 76
Tableau 8 : Réponses aux questions d'ordre général et d'hygiène buccale 84
Tableau 9 : Réponses aux questions des habitudes alimentaires 85
Tableau 10 : Concentration des ADN ng/µL de nos échantillons salivaires 87

RESUME EN FRANÇAIS :

La salive est un "biofluide" idéal, de par son accessibilité non invasive, pour étudier des biomarqueurs liés à une pathologie.

Notre travail a montré que la salive pourrait permettre un diagnostic précoce et un suivi permanent de pathologie systémique comme le diabète.

Nous avons réalisé une étude pilote sur les métabolites, les activités enzymatiques et les profils microbiens de la salive et leurs variations avec la glycémie sanguine. Nous avons comparé les paramètres salivaires selon la glycémie sanguine à jeun et post prandiale. Nos résultats montrent une activité lipase évoluant avec la glycémie sanguine ainsi qu'un profil microbien en correspondance avec les résultats publiés dans la littérature, confirmant l'intérêt croissant de la salive comme « fluide biologique de diagnostic ».

Ce travail a permis d'étudier le potentiel de la salive comme biomarqueur dans la prévention des troubles de la glycémie et ouvre des perspectives pour la prise en charge des patients diabétiques.

SUMMARY IN ENGLISH

Saliva is an ideal biofluid for studying disease-related biomarkers because of its easy sampling.

Our work shows that studying saliva could allow an early diagnosis and a subsequent follow-up in systemic diseases such as diabetes.

We have performed a pilot study on metabolites, enzyme activities and microbial profiles in saliva, and their variation with blood glucose levels. We have compared salivary parameters in fasting and fed individuals. Our results show changes in salivary lipase activity and in the bacterial species present after feeding, in agreement with published results, confirming the growing interest in saliva as a "diagnostic biological fluid".

This work has allowed us to study the potential of saliva as a biomarker in pathologies involving glycemia and opens perspectives for the treatment of diabetic patients.

MINTY Matthieu 2017 TOU3 3059

La salive et la santé : des biomarqueurs aux biocapteurs

RESUME EN FRANÇAIS :

La salive est un "biofluide" idéal, de par son accessibilité non invasive, pour étudier des biomarqueurs liés à une pathologie.

Notre travail a montré que la salive pourrait permettre un diagnostic précoce et un suivi permanent de pathologie systémique comme le diabète.

Nous avons réalisé une étude pilote sur les métabolites, les activités enzymatiques et les profils microbiens de la salive et leurs variations avec la glycémie sanguine. Nous avons comparé les paramètres salivaires selon la glycémie sanguine à jeun et post prandiale. Nos résultats montrent une activité lipase évoluant avec la glycémie sanguine ainsi qu'un profil microbien en correspondance avec les résultats publiés dans la littérature, confirmant l'intérêt croissant de la salive comme « fluide biologique de diagnostic ».

Ce travail a permis d'étudier le potentiel de la salive comme biomarqueur dans la prévention des troubles de la glycémie et ouvre des perspectives pour la prise en charge des patients diabétiques.

TITRE EN ANGLAIS: Saliva in disease diagnosis: from biomarkers to biosensors

RESUME EN ANGLAIS page 100

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Chirurgie dentaire

MOTS-CLES : Salive, Glycémie sanguine, Diabète, Biomarqueurs, Biocapteurs, Santé buccale, Microbiome, Microbiote, Pathologie systémique

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :
Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de chirurgie dentaire 3 chemin des Maraîchers 31062 Toulouse Cedex

Directeur de thèse : Docteur Vincent BLASCO-BAQUE