

Année : 2012

Thèse N° 046

LE MONOXYDE D'AZOTE EN ODONTOLOGIE

Thèse pour le Diplôme d'Etat de
Docteur en chirurgie dentaire

Présentée et soutenue publiquement par

Claire LE GOFFE

Née le 6 avril 1974

Le 14/01/2013 devant le jury ci-dessous :

Président : Professeur Assem SOUEIDAN

Assesseur : Docteur Xavier STRUILLLOU

Assesseur : Docteur Cécile DUPAS

Directeur : Professeur Brigitte Alliot-licht

UNIVERSITÉ DE NANTES	
Président	Pr. Olivier LABOUX
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE	
Doyen	Pr. Yves AMOURIQ
Assesseurs	Dr. Stéphane RENAUDIN Pr. Assem SOUEIDAN Pr. Pierre WEISS
Professeurs des Universités Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.	
Monsieur Yves AMOURIQ Madame ALLIOT-LICHT Brigitte Monsieur GIUMELLI Bernard Monsieur JEAN Alain	Monsieur Philippe LESCLOUS Madame PEREZ Fabienne Monsieur SOUEIDAN Assem Monsieur WEISS Pierre
Professeurs des Universités	
Monsieur BOHNE Wolf (<i>Professeur Emérite</i>)	Monsieur BOULER Jean-Michel
Praticiens Hospitaliers	
Madame Cécile DUPAS	Madame Emmanuelle LEROUXEL
Maîtres de Conférences Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.	Assistants hospitaliers universitaires des C.S.E.R.D.
Monsieur AMADOR DEL VALLE Gilles Madame ARMENGOL Valérie Monsieur BODIC François Madame DAJEAN-TRUTAUD Sylvie Monsieur DENIAUD Joël Madame ENKEL Bénédicte Monsieur GAUDIN Alexis Monsieur HOORNAERT Alain Madame HOUCHMAND-CUNY Madline Monsieur KIMAKHE Saïd Monsieur LAGARDE André Monsieur LE BARS Pierre Monsieur LE GUEHENNEC Laurent Madame LOPEZ-CAZAUX Séréna Monsieur MARION Dominique Monsieur NIVET Marc-Henri Monsieur RENAUDIN Stéphane Madame ROY Elisabeth Monsieur STRUILLOU Xavier Monsieur UNGER François Monsieur VERNER Christian	Monsieur BADRAN Zahi Madame BERTHOU STRUBE Sophie Madame BORIES Céline Madame BOUVET Gaëlle Monsieur CAMPARD Guillaume Monsieur COIRIER François Monsieur DEUMIER Laurent Monsieur FREUCHET Erwan Monsieur FRUCHET Aurélien Madame GOAEMAERE GALIERE Hélène Monsieur LANOISELEE Edouard Madame Eve MALTHIERY Monsieur MARGOTTIN Christophe Madame ODIER Amélie Monsieur PAISANT Guillaume Madame RICHARD Catherine Monsieur Morgan ROLOT Monsieur TOURE Amadou (Assistant associé)

Par délibération en date du 6 décembre 1972, le Conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

Remerciements

Monsieur le **Professeur Assem SOUEIDAN**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier des centres de soins d'enseignement et de recherches dentaires

Docteur de l'Université de Nantes

Habilité à diriger des recherches

Chef de département de Parodontologie

Merci de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Madame le **Professeur Brigitte ALLIOT-LICHT**

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier des centres de soins d'enseignement et de recherches dentaires

Docteur de l'Université de Nantes

Habilitée à diriger des recherches

Chef de département de Sciences biologiques

Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'encadrer cette thèse.

Veillez recevoir mon admiration et ma gratitude pour l'énergie, la sincérité et le respect que vous accordez à vos étudiants et à votre métier.

Monsieur **Xavier STRUILLOU**

Maître de Conférences des Universités

Praticien hospitalier des centres de soins d'enseignement et de recherches dentaires

Département de parodontologie

Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer au jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour m'avoir transmis votre intérêt pour la parodontologie au cours de mes années d'études.

A Madame Cécile DUPAS

Ancien assistant hospitalo-universitaire

Praticien hospitalier au centre hospitalier Universitaire de Nantes

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Merci aussi pour votre accueil et votre aide bienveillante lors de mes premiers pas à la faculté de dentaire...

Merci à tous ceux qui m'ont permis d'apprendre un nouveau métier :

Merci au professeur Giumelli qui a rendu possible ma venue à la faculté d'odontologie de Nantes.

Merci au Pr Boy-Lefevre et au Dr Descroix pour leurs conseils à l'aube de mon changement de parcours professionnel.

Merci aux enseignants de la fac de Nantes dont je garderai le meilleur souvenir : Pr Olivier Laboux, Dr Sylvie Dajean-Trutaud, Dr André Lagarde, Dr Zahi Badran, Dr Christophe Margottin, Dr Elisabeth Roy, Dr Tony Gouré, Dr Sophie Cazaux et Dr Sylvain Leborgne...

Merci aux Drs Maire, Macé et Giraud ainsi qu'à leurs assistantes pour leur accueil, leur confiance et leur gentillesse : travailler à vos côtés pendant 7 mois fut un réel plaisir.

Merci aux gens que j'aime :

Un grand merci à maman, pour son dévouement sans limites à sa famille et aux gens qu'elle aime.

Merci à Marco pour ses attentions, son humour, sa présence et son écoute chaque fois que j'en ai besoin.

Merci à Fof, pour son amitié précieuse et pour tous ces moments où son réconfort et son soutien m'ont permis de tenir...

Merci à Hervé, pour ses cris d'encouragements quasi quotidiens, ses séances d'ostéo à l'arrache et son amitié précieuse...

Merci à Anne pour son écoute, sa bienveillance et son soutien depuis toujours.

Merci à ma grande famille, pour leur amour et le plaisir que j'ai, à chaque fois, de les voir.

Merci à mes complices de fac et autres folies, Andréa et Mathilde !

Merci au Professeur Victor Darley-USmar pour sa confiance, son intelligence, son amitié et pour l'immense respect qu'il prodigue à ses étudiants et ses collaborateurs.

Merci à mes amis de l'UAB et de Birmingham avec une mention spéciale pour Joo-yeun, Rakesh, Scott, Dario, Amanda, Rhea et Mary.

Merci à l'équipe plané de l'espace des sciences de Rennes pour m'avoir remis la tête dans les étoiles...

Merci, enfin à tous les amis que je n'ai pas cités et que je néglige parfois, vous m'êtes précieux...

A mon dentiste préféré : papa,

*Parce qu'il aime (dans le désordre !) :
les gens, les fleurs, Bach, les chiens, le vin...
et moi !*

Liste des abréviations.....	15
I. Intro générale.....	17
II. Le NO et ses dérivés: une chimie complexe.....	18
II-1. Source de NO en biologie : les NO synthases	18
II-2. Chimie du NO: les différentes espèces impliquées	18
II-2-A Effet directs	19
II-2-B Effets indirects.....	21
II-3. Notion de stress oxydatif.....	23
III. NO et physiologie	24
III-1. La guanylate cyclase soluble	24
III-2. Un exemple de régulation dépendant du système NO-GCs-GMPc: la vasodilatation induite par le NO	25
IV. NO et inflammation	27
V. NO et inflammation parodontale:	30
V-1. Rappels sur l'inflammation dans les parodontites.....	30
V-1-A L'inflammation parodontale.....	30
V-1-B La destruction tissulaire induite dans les parodontites	31
V-2. Participation du NO dans l'inflammation parodontale: Les données <i>in vivo</i>	33
V-2-A Augmentation de la production de NO dans les maladies parodontales	33
V-2-B Inhibition de la production NO lors d'inflammation parodontale.....	39
V-2-C Effets protecteur des donneurs de NO.....	46
V-3. Intérêt de l'étude du rôle du NO en parodontologie.....	49
VI. NO et pulpe dentaire: les données de la littérature	51
VI-1. Bref rappel sur la pulpe dentaire.....	51
VI-2. Rôles physiologiques potentiels du NO dans la pulpe	52
VI-2-A Présence des NOS constitutives	52
VI-2-B Présence d'une signalisation dépendante du NO dans la pulpe dentaire.....	53

VI-2-C	NO et circulation sanguine pulpaire	53
VI-3.	NO et inflammation pulpaire	54
VI-3-A	Réaction inflammatoire et complexe dentino-pulpaire	54
VI-3-B	Production de NO lors de l'inflammation pulpaire	57
VI-3-C	Effets des inhibiteurs de NO sur l'inflammation pulpaire.....	59
VI-3-A	NO, odontoblastes et dentinogénèse réactionnelle	62
VI-3-B	Intérêt de l'étude du NO dans la pulpe.....	63
VII.	Conclusion	66
	Références bibliographiques	67
	Table des Figures.....	74
	Lexique	75

Liste des abréviations

Aa: Actinobacillus actinomycetemcomitans

ADN: Acide désoxyribonucléique

ECM: Matrice extracellulaire

CAM: Calmoduline

Cyt c: Cytochrome c

GCs: Guanylate cyclase soluble

GMPc: Guanosine-3',5' monophosphate cyclique

GTP: Guanosine triphosphate

GSH: Glutathion réduit

GSNO: Nitrosoglutathion

GSSG: Glutathion oxydé

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

Hb: Oxyhémoglobine

HO₂: Radical hydroperoxyde

HOCl: Acide hypochlorique

IFN γ : Interféron gamma

Il: Interleukine

L-NAME: L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (inhibiteur NOS non spécifique)

L-NMMA: L-NG-monomethyl Arginine citrate(inhibiteur NOS non spécifique)

LPS: Lipopolysaccharide

MDA: Malonaldéhyde

MMP: Métalloprotéases

NADP⁺: Nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate oxydé

NADPH: Nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate réduit

NF- κ B: Nuclear factor kappa B

NO: Monoxyde d'azote

NOSc: NO synthase constitutive

NOSe: NO synthase endothéliale (NOS3)

NOSi: NO synthase inductible

NOSi^{-/-}: Souris invalidées pour le gène de la NOSi

NOSn: NO synthase neuronale (NOS1)
NOx: Espèces autoxydées du monoxyde d'azote
 $O_2^{\cdot-}$: Ion superoxyde
 O_2 : Dioxygène
OH \cdot : Radical hydroxyle
ONOO $^-$: Peroxynitrite
OPG: Ostéoprogéstérine
PGE2: Prostaglandine E2
Pg: Porphyromonas gingivalis
PMN: Polynucléaires neutrophiles
PUFA: Acide gras polyinsaturé
RANK: Receptor activator of nuclear factor- κ B
RANKL :Receptor activator of nuclear factor- κ B Ligand
RNS, RNOS: Reactive nitrogen species
RO \cdot : Radical alkoxyle
RO $_2^{\cdot}$: Radical peroxyde
ROOH: Peroxyde
ROS: Reactive oxygen species
SOD: Superoxyde dismutase
TIMP: Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TyrO \cdot : Radical tyrosyl
WT: Souris de phénotype sauvage (Wild type en anglais)

I. Intro générale

Certains dérivés nitrés comme la trinitrine ont été utilisés pendant plus d'un siècle dans le traitement des angines de poitrine. Leur mode d'action, cependant, ne fut compris qu'en 1987, lors de l'identification d'un puissant vasodilatateur, l'EDRF « endothelium-derived relaxing factor » qui s'est avéré être un composé simple associant un atome d'azote à un atome d'oxygène, le monoxyde d'azote: NO (40). Louis J. Ignarro, Ferid Murad et Robert F. Furchgott reçurent le prix Nobel de médecine en 1998 pour cette découverte.

Depuis, le NO a suscité un intérêt extraordinaire en biologie et en médecine. Le NO et les espèces qui en dérivent sont aujourd'hui reconnus non seulement pour jouer un rôle fondamental dans la régulation d'un grand nombre de fonctions cellulaires mais aussi en tant que puissants agents cytotoxiques endogènes.

Le NO est ubiquitaire et est impliqué dans les fonctions physiologiques de nombreux grands systèmes (cardiovasculaires, pulmonaires, rénal, digestifs...). Il participe aussi au développement de nombreuses pathologies, ce qui lui vaut d'être étudié dans presque tous les domaines de la médecine.

Cette thèse a pour objectif de montrer que l'étude du NO suscite aussi un intérêt en odontologie et qu'il intervient par exemple dans des processus physiologiques et pathologiques de la pulpe dentaire et du parodonte.

Nous verrons dans un premier chapitre que la diversité des effets biologiques du NO est liée à sa chimie complexe. Le NO est, en effet, à l'origine de différents dérivés chimiques dont la nature va dépendre de la source de production du NO.

Après avoir brièvement illustré, au travers d'exemples, la participation du NO en physiologie et dans l'inflammation, nous verrons, en nous appuyant sur les données de la littérature, quelles sont les bases de son implication dans l'inflammation parodontale.

Nous aborderons ensuite les rôles potentiellement joués par le NO dans la pulpe dentaire saine et inflammatoire.

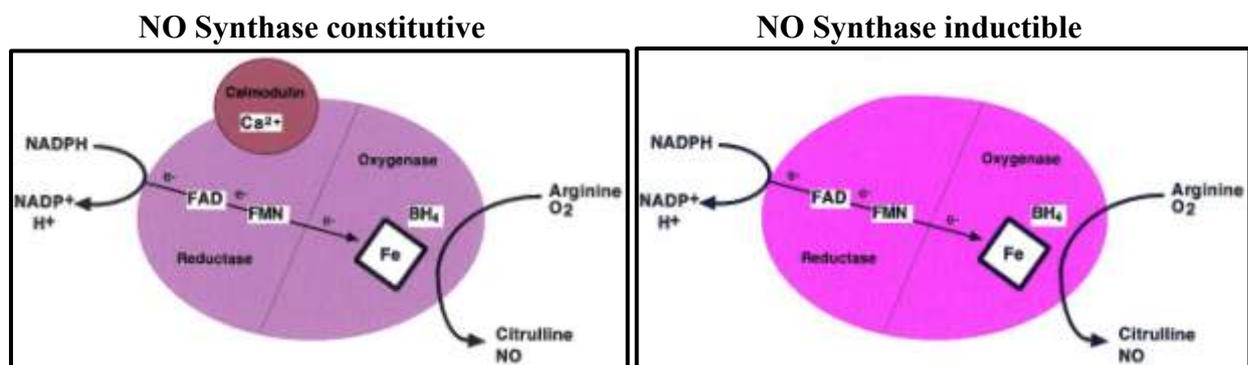
Nous essaierons, en outre, de démontrer, tout au long de cette thèse comment une meilleure connaissance des mécanismes faisant intervenir le NO dans la physiologie et la physiopathologie de l'organe dentaire permettrait d'améliorer la prise en charge des patients en odontologie.

II. Le NO et ses dérivés: une chimie complexe

II-1. Source de NO en biologie : les NO synthases (2,68)

Le monoxyde d'azote est synthétisé à partir du groupement guanidine de la L-arginine par des NADPH-oxydases spécifiques, les NO synthases (NOS). Il en existe deux types: la NOS constitutive (NOSc) et la NOS inducible (NOSi). Deux isoformes de la NOSc ont été identifiées. La NOS1 ou neuronale (NOSn) et la NOS3 ou endothéliale (NOSe). Elles doivent leur nom aux types cellulaires dans lesquels elles ont été caractérisées et ont une activité dépendante du complexe Ca^{2+} -calmoduline. La NOSi est induite lors de processus inflammatoires par différents stimuli tels que des cytokines comme l'interleukine-1 (IL-1), l'interféron gamma ($\text{IFN}\gamma$) ou le « tumor necrosis factor alpha » ($\text{TNF}\alpha$) ou des endotoxines bactériennes comme le lipopolysaccharide (LPS) et son activité est indépendante du calcium.

Figure 1: Les NO Synthases



D'après Nathan 1992

II-2. Chimie du NO: les différentes espèces impliquées (37,86)

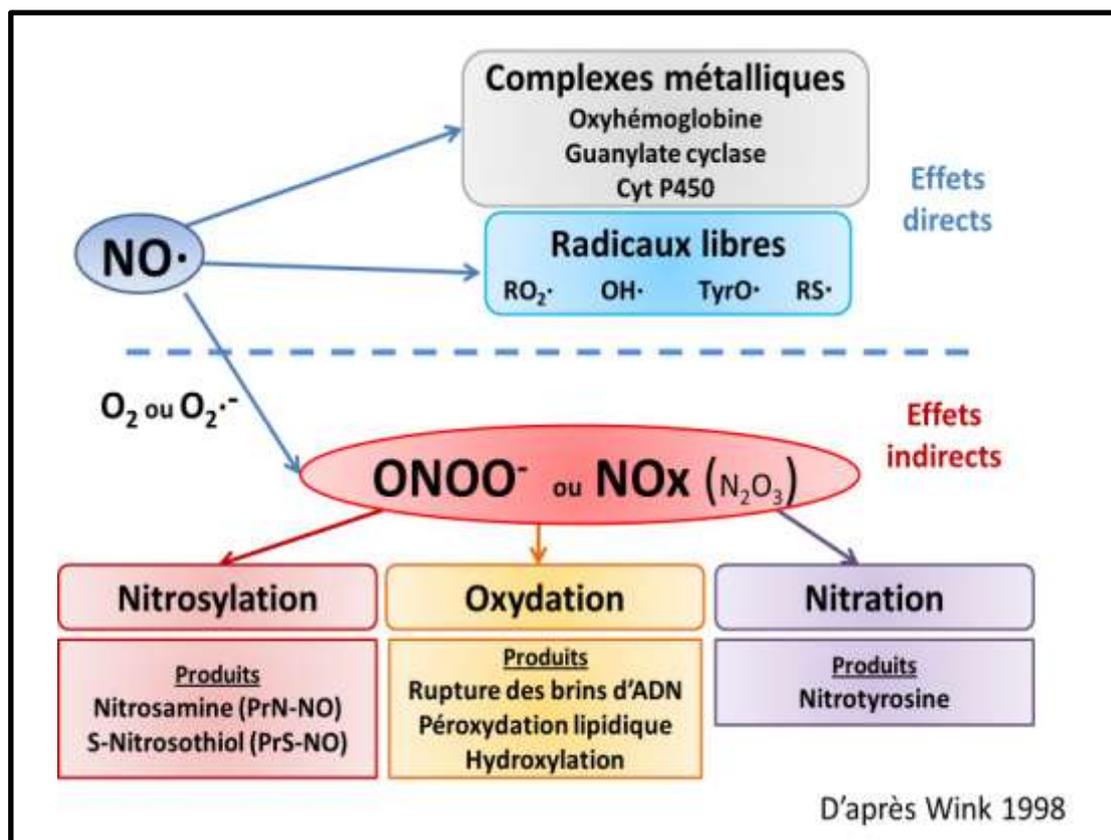
Le NO est un radical libre¹, très hydrophobe, ce qui lui permet de diffuser librement au travers des membranes biologiques.

La chimie du NO est très complexe et comprend un grand nombre de réactions. C'est de cette complexité que le NO tire ses nombreux effets biologiques. Wink propose de simplifier cette chimie en distinguant les effets directs des effets indirects du NO (86). Les effets directs sont représentés par les réactions dans lesquelles le NO radicalaire (noté NO^\bullet) interagit de manière directe avec la molécule cible. Au contraire, les effets indirects mettent en jeu des composés formés à partir de la réaction du NO^\bullet avec l' O_2 (dérivés auto-oxydés du NO ou NO_x) ou de la réaction du NO^\bullet avec l'ion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

¹ Voir définition dans lexique

Outre le fait d'expliquer les rôles multiples du NO, cette séparation effets directs/effets indirects présente l'avantage de rendre compte de la réactivité du NO en fonction de son taux de production. Ainsi, les NOSc produisant des quantités relativement faibles de NO sous forme radicalaire, plutôt à l'origine des effets directs du NO. Au contraire, les NOSi induites lors d'une agression, génèrent des flux de NO beaucoup plus importants susceptibles, en milieu aérobie, de former des NOx. La figure ci-dessous résume les effets directs et indirects du NO.

Figure 2: Effets directs et indirects du NO



II-2-A Effet directs

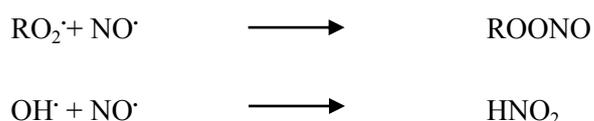
Le NO· n'interagit directement qu'avec les composés radicalaires et les métaux de transition.

a- Réactions avec les composés radicalaires

La réaction du NO· avec certains radicaux très toxiques tels que le radical hydroxyl (OH·) ou les radicaux peroxy (RO₂·) permet d'inhiber les dommages causés par ces espèces chimiques²

² En chimie, le terme espèce chimique est une appellation générique se référant à un ensemble d'entités chimiques identiques: chaque entité est soit un atome (espèce chimique atomique) soit un groupe d'atomes liés qui peut, selon sa charge électrique et sa configuration électronique, être une molécule, un ion ou un radical.

et confère ainsi un rôle antioxydant au NO. Ainsi, il a été montré que le NO· était capable d'inhiber les peroxydations lipidiques (78).



Le NO· peut aussi réagir avec le radical tyrosyl (TyrO·). Cette réaction est à l'origine de certains effets inhibiteurs du NO· puisque des résidus tyrosines sont situés dans le site actif d'enzymes et sont essentiels à l'activité de ces enzymes.

Si le NO· ne réagit pas directement avec les thiols, il peut néanmoins conduire à la formation S-nitrosothiol (RSNO) en réagissant avec un radical thiyle (RS·).



b- Réactions avec les métaux de transition

Il existe trois types de réactions entre le NO et les métaux (Me). Le NO· peut réagir avec

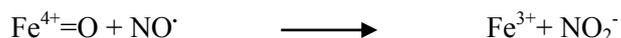
1. les complexes « dioxygène-métal »
2. les complexes « oxométalliques » (Me=O)
3. les centres métalliques pour former des « nitrosyles métalliques » (Me-NO).

Le complexe dioxygène-métal le plus connu est celui formé par l'oxyhémoglobine (Hb) et le Fe. Le NO· peut réagir avec le fer complexé avec l'O₂ contenu dans l'hème de l'oxyhémoglobine pour former de la méthémoglobine (metHb) et du nitrate.



Cette réaction est utilisée par l'organisme pour contrôler *in vivo* les mouvements et la concentration de NO· dans les cellules (54).

Les groupements Me=O (par exemple Fe=O), très oxydants, sont formés par l'oxydation des métaux avec des agents tels que l'H₂O₂. La réaction rapide du NO· avec ces complexes, permet de les neutraliser et constitue ainsi une des actions anti-oxydantes du NO·.



Le NO· peut réagir avec les métaux de transition (et notamment le Fe) d'un grand nombre de métalloprotéines pour former des complexes métalliques « nitrosylés » plus stables (Me-NO). Cette nitrosylation entraîne une modification de l'activité enzymatique de ces métalloprotéines (activation ou inhibition de l'enzyme). Ainsi, le NO· réagit avec le Fe

hémérique de la guanylate cyclase soluble (GCs). La formation du complexe Fe-NO active la GCs, alors capable de catalyser la formation de cGMP, messager secondaire à l'origine de la plupart des effets régulateurs du NO. C'est par exemple au travers de ce type de réaction que le NO exerce son effet vasodilatateur (voir chapitre III).

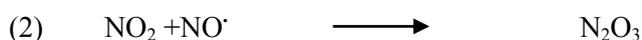
La formation de complexes Fe-NO peut aussi entraîner l'inactivation de métalloprotéines telles que les enzymes de la famille des cytochromes P450, les NOS ou encore un des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire, le Cytochrome c (Cyt c) (86). Dans ces trois cas, le NO inhibe de manière réversible ces enzymes, en empêchant l'O₂ de se lier au Fe. Les cytochromes P450 sont aussi soumis à une inhibition irréversible par le NO. Cependant, il s'agit dans ce cas de réactions indirectes, faisant intervenir des NOx. De la même manière, outre une inhibition réversible via son interaction avec le Cyt c, le NO peut irréversiblement et par des effets indirects inhiber la respiration cellulaire. Les NOx sont en effet capables d'inhiber irréversiblement les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il apparaît donc que le NO peut, sur une même fonction, entraîner des modifications réversibles ou irréversibles selon qu'il réagit de manière directe ou indirecte.

II-2-B Effets indirects

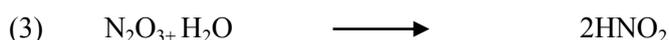
Les effets indirects du NO font intervenir les espèces dérivées de la réaction du NO avec l'O₂ ou l'ion superoxyde (O₂⁻).

a- Réactions du NO avec l'O₂

Ces réactions sont à l'origine de composés plus ou moins réactifs. Les principales espèces chimiques susceptibles de se former dans des systèmes biologiques par auto-oxydation sont le « dinitrogène trioxyde » (N₂O₃) (Réactions 1 et 2) et le nitrite.



En milieu aqueux, une grande partie du N₂O₃ est hydrolysée en nitrite.



Cette réaction est une réaction du 3^{ème} ordre mais si l'on considère l'O₂ en large excès en milieu aérobie l'ordre partiel de l'auto-oxydation du NO est une réaction du second ordre par rapport au NO. Cela signifie que la vitesse de réaction et donc la demi-vie du NO dépend de sa concentration initiale. Ainsi, plus le NO est dilué et plus sa durée de vie est longue. Au

contraire, si la concentration de NO[•] initiale est importante, par exemple lorsqu'il est produit par la NOSi, la formation d'intermédiaires issus de l'auto-oxydation (ex : N₂O₃) est augmentée de manière exponentielle. Le taux de production des NOx est accéléré dans les couches lipidiques des systèmes biologiques. Ainsi, les membranes sont des lieux privilégiés de l'auto-oxydation du NO[•].

Le N₂O₃ réagit selon des réactions de nitrosylation ou nitrosation (addition d'un groupement NO) avec des groupements amines et thiols des protéines ou avec la GSH pour former des N-nitrosamines (PrN-NO), des S-nitrosothiols (PrS-NO), et du nitrosoglutathion (GSNO). La nitrosylation des thiols entraîne un grand nombre d'effets dont l'inhibition de l'activité enzymatique de la protéine nitrosylée ou la formation de S-nitrosothiol capables de moduler des signaux de transduction (38, 84). Les S-nitrosothiols jouent aussi un rôle dans le transport du NO[•], car ils sont capables de libérer du NO[•], spontanément ou au travers de réactions métaboliques.

b- Réactions du NO[•] avec l'O₂⁻

La réaction du NO[•] avec l'O₂⁻ génère un dérivé très réactif à l'origine de nombreux dommages intracellulaires, le peroxynitrite (ONOO⁻) (7,86).



Le peroxynitrite est un oxydant puissant notamment capable d'oxyder les thiols, de nitrer (addition d'un groupement NO₂) les résidus tyrosines (formation de nitrotyrosines), d'oxyder les guanosines de l'ADN, ou même d'initier des peroxydations lipidiques³ (39).

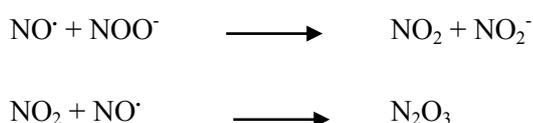
Au contraire du NO[•], l'O₂⁻ ne diffuse pas au travers des membranes. L'ONOO⁻ sera donc généré au lieu de production de l'O₂⁻.

Les sources d'O₂⁻ au sein des tissus sont nombreuses. Parmi les plus notables on peut citer la NADPH-oxydase des phagocytes activés (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages) dont le principal rôle est de produire de grande quantité d'ions superoxyde. Les phagocytes et les leucocytes constituent donc une source importante d'O₂⁻. D'autres enzymes dont la vocation première n'est pas de produire de l'O₂⁻ telles que la xanthine oxydase (enzyme impliquée dans le métabolisme des purines), la lyxoygénase et les cyclooxygénases (enzymes impliquées dans la synthèse des prostanoïdes) peuvent néanmoins générer de l'ion superoxyde. La formation de O₂⁻ à partir d'O₂ peut aussi se produire spontanément, plus particulièrement dans des environnements aérobies riches en électrons

³ Voir définition dans lexique

comme par exemple au voisinage de la membrane interne mitochondriale qui contient la chaîne respiratoire des cellules.

La formation de ONOO^- dépend de la présence de O_2^- et de NO^\cdot . Ainsi, des enzymes susceptibles de détoxifier ces deux espèces à savoir la superoxyde dismutase (SOD) pour O_2^- et l'oxyhémoglobine pour le NO^\cdot vont être capables d'inhiber la formation de ONOO^- . Par exemple, le taux de réaction de la SOD avec O_2^- est similaire à celui de O_2^- avec le NO^\cdot de sorte que de faibles concentrations de cette enzyme vont entrer en compétition avec la formation de ONOO^- (86). Curieusement, un autre facteur limitant la formation de ONOO^- est l'excès de NO^\cdot . En effet, lorsque le NO^\cdot est en excès, la formation de peroxynitrite diminue au profit de la formation de N_2O_3 (86).



II-3. Notion de stress oxydatif

Physiologiquement, les radicaux libres et les espèces oxydantes principalement représentés par les dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote (Réactive oxygen and nitrogen species en anglais : ROS et RNOS) sont produits dans les cellules en faible quantité et participent à la signalisation intracellulaire des organismes aérobies. Cette production est maîtrisée par un ensemble de systèmes cellulaires dits « antioxydants » capables de détoxifier les espèces oxydantes en les neutralisant. Dans de nombreuses situations pathologiques, et notamment lors de l'inflammation, la modification du statut redox d'une cellule ou d'un tissu résultant d'un déséquilibre entre pro- et antioxydants en faveur de l'état pro-oxydant entraîne ce que l'on appelle un « stress oxydatif ». De nombreuses études montrent que dans ces situations, la perturbation de l'homéostasie redox est délétère pour les cellules et peut aboutir à de nombreux dommages tissulaires.

Le NO , en tant que composé radicalaire, ainsi que certains de ses dérivés, participent aux réactions d'oxydo-réduction intracellulaires. Nous avons vu que dans certaines conditions le NO principalement sous forme de dérivés oxygénés (NO_x et ONOO^-) est un puissant oxydant alors qu'il peut aussi jouer un rôle antioxydant, notamment, en limitant la formation de peroxynitrite ou en réagissant avec certains radicaux très toxiques tels que OH^\cdot ou les RO_2^\cdot .

III. NO et physiologie

Les rôles attribués au NO, au sein de l'organisme, sont multiples. Il est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques (vasculaire, cardiaque, rénale, respiratoire, digestive, neurologique, érectile...).

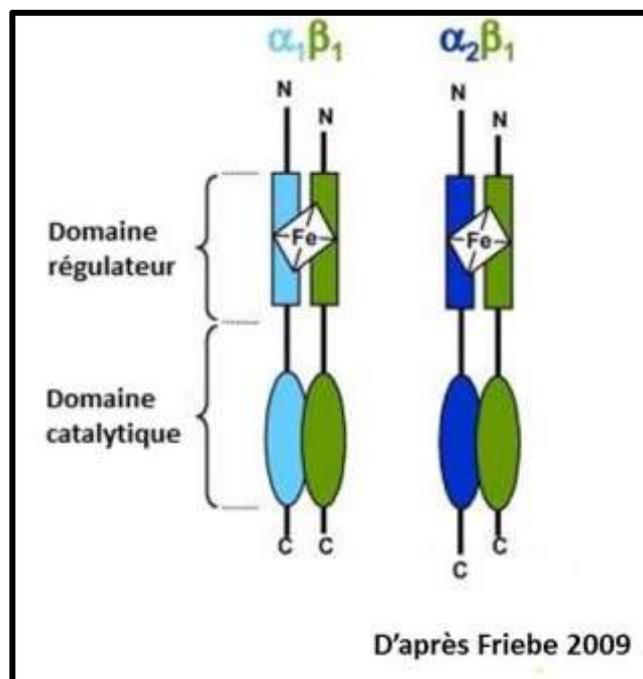
Nous n'allons pas dans ce chapitre décrire l'ensemble des mécanismes impliquant le NO dans ses différentes fonctions physiologiques mais plutôt, illustrer comment le NO peut être impliqué dans la régulation de fonctions physiologiques au travers d'un exemple, celui des mécanismes par lequel il induit une vasodilatation.

En effet, parmi les rôles attribués au NO, celui participant à la régulation de la physiologie vasculaire au travers de ses propriétés vasodilatatrices, est probablement le plus documenté et le mieux compris.

III-1. La guanylate cyclase soluble (18,21,23)

La plupart des effets physiologiques régulés par le monoxyde d'azote, font intervenir l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs). C'est d'ailleurs par ce biais que le NO exerce des effets vasodilatateurs.

Figure 3: Les 2 isoformes actives de la guanylate cyclase soluble



La guanylate cyclase soluble (voir figure ci-dessus) est un hétérodimère constitué d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Deux types de dimères sont reconnus comme actifs; $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$. La partie N-terminale contient un noyau hémique sensible au NO. La GCs est, de ce

fait, souvent citée en tant que récepteur soluble du NO. Ce dernier peut, en effet, se fixer sur le groupement prosthétique héminique et induire ainsi une modification de la conformation entraînant une activation de la guanylate cyclase. Cette dernière est alors capable de catalyser la formation de la guanosine-3',5' monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanosine triphosphate (GTP). Le GMPc est un second messager qui pourra activer différentes protéines cibles et induira ainsi différentes cascades signalétiques et *in fine* différents effets selon les cellules et les tissus dans lesquels il est produit. Une augmentation intracellulaire de cGMP peut par exemple activer des kinases qui, par phosphorylation de molécules cibles induiront l'ouverture ou la fermeture d'un canal ionique.

III-2. Un exemple de régulation dépendant du système NO-GCs-GMPc: la vasodilatation induite par le NO (18,20,23)

L'endothélium des vaisseaux sanguins produit du monoxyde d'azote pour déclencher le relâchement de sa gaine de muscle lisse, provoquant ainsi une vasodilatation et un accroissement du débit sanguin.

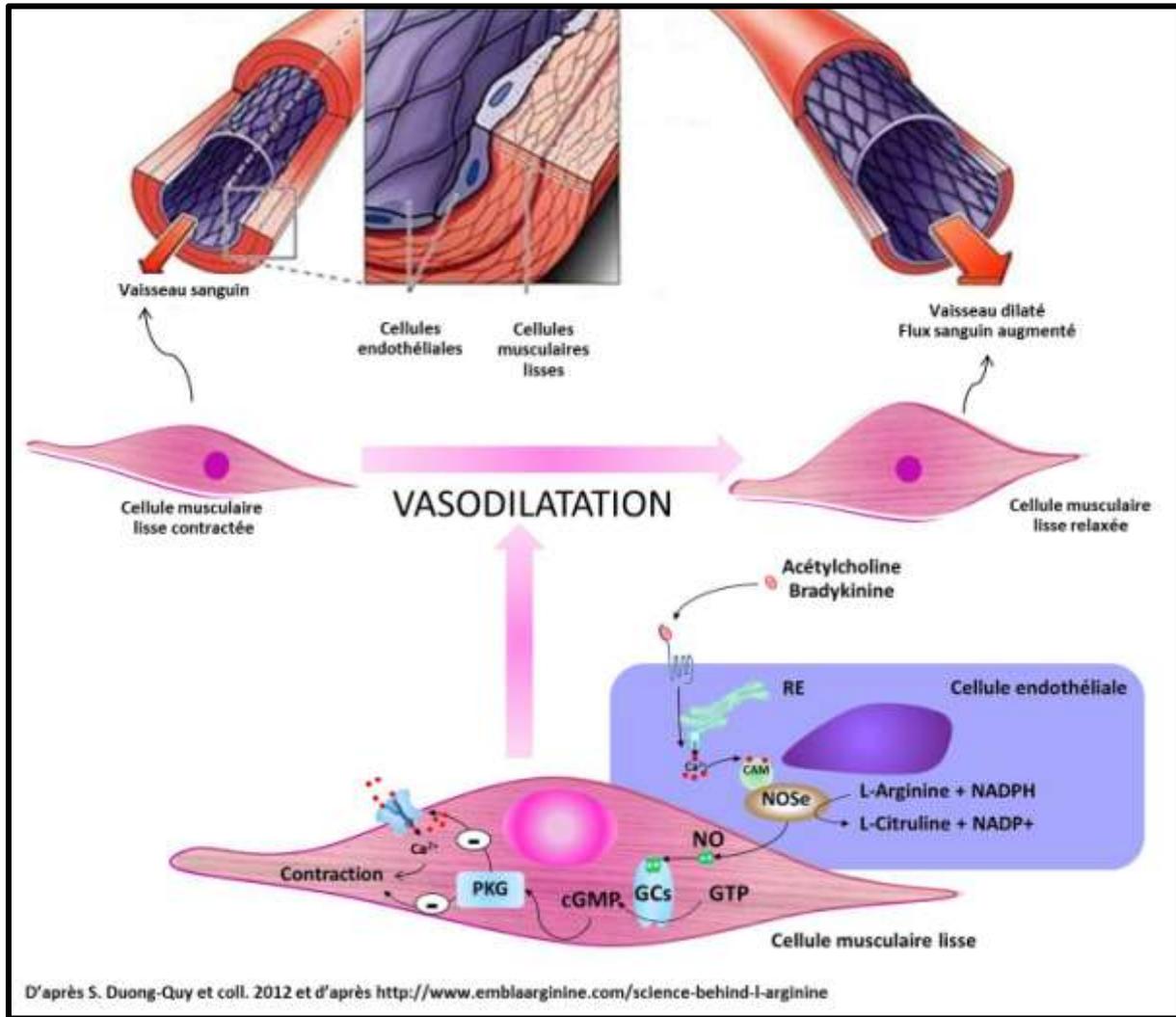
Ce processus implique la participation de deux types cellulaires différents: les cellules endothéliales qui tapissent les parois vasculaires et les cellules musculaires lisses qui forment une gaine autour des vaisseaux (voir Figure 4).

Certaines hormones telles que l'acétylcholine ou la bradykinine, peuvent se lier à des récepteurs situés dans la membrane des cellules endothéliales et induire la libération intracellulaire d'ion calcium par le réticulum endoplasmique (RE). Le calcium ainsi libéré va se lier au complexe calmoduline (CAM) de la NO synthase endothéliale et induire la production NO à partir d'arginine. Le NO va pouvoir diffuser de la cellule endothéliale vers la cellule musculaire lisse adjacente où il active la guanylate cyclase soluble. Cette dernière convertit alors le GTP en un second messager cyclique, le GMPc, qui active la protéine kinase G (PKG).

Cette activation va induire une relaxation, par diminution de la concentration en calcium cytosolique avec pour conséquence la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine et/ou par diminution de la sensibilité des myofilaments pour le calcium par activation de la phosphatase des chaînes légères de la myosine.

La relaxation des cellules musculaires lisses entraînera une augmentation de la lumière des vaisseaux et une augmentation du flux sanguin.

Figure 4: NO et vasodilatation: Mécanismes d'actions



Le monoxyde d'azote intervient par son effet relaxant dans plusieurs fonctions physiologiques. Nous verrons dans le chapitre VI-2-C qu'il est aussi impliqué dans la régulation de la circulation sanguine pulpaire.

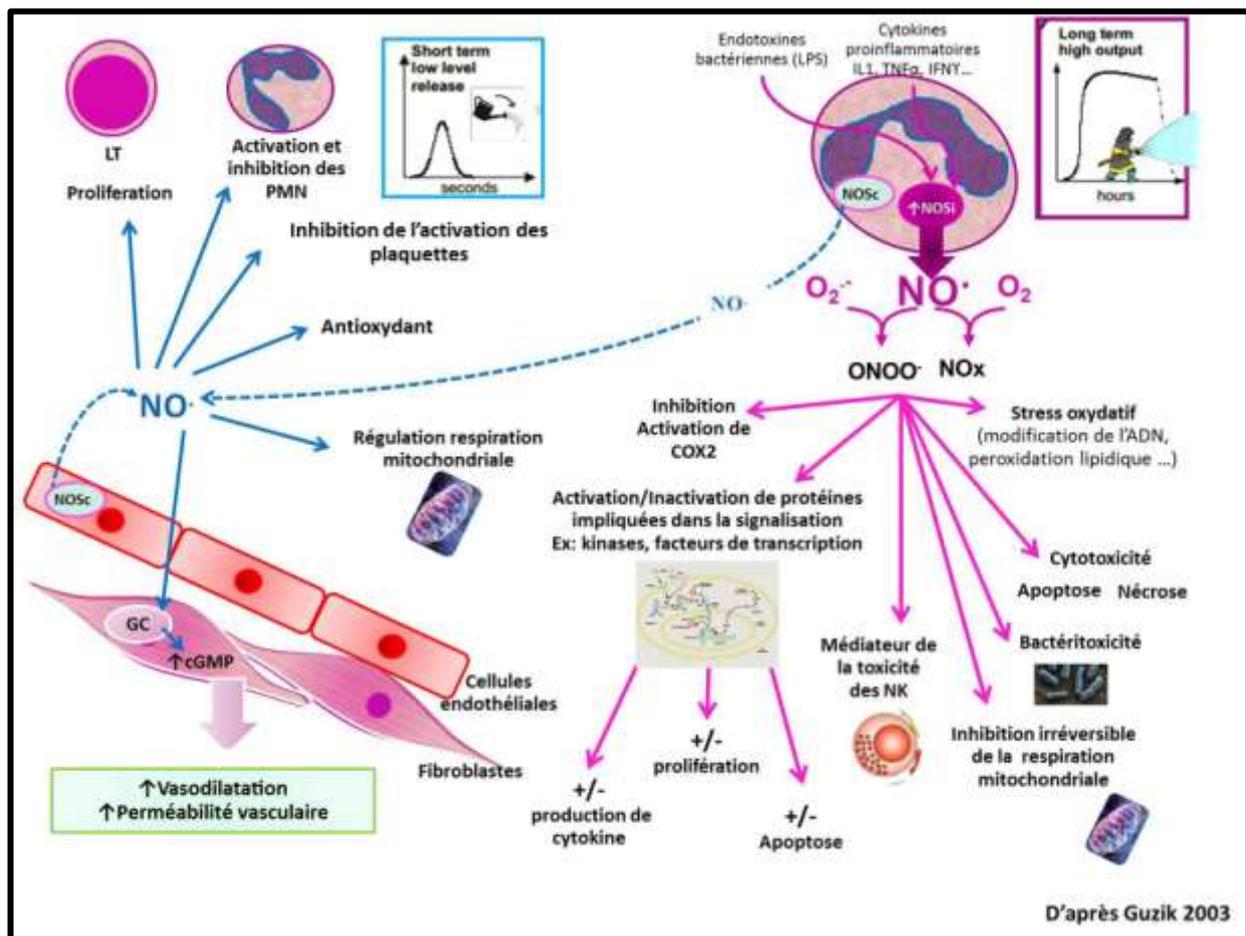
C'est aussi au travers de la production de GMPc par activation de la guanylate cyclase que le NO produit par les NOSn intervient dans la neurotransmission. A la différence de la majorité des autres neurotransmetteurs, dont l'action dans la fente synaptique a pour cible unique le neurone post-synaptique, il diffuse facilement et peut atteindre plusieurs neurones environnants, y compris des neurones non interconnectés par des synapses. On pense que ce processus est impliqué dans la mémorisation à long terme.

IV. NO et inflammation (28)

La plupart des données mentionnées dans ce chapitre sont tirées de la revue de Guzik et coll. (28). Ne seront donc référencés ici que les quelques données ne provenant pas de cette revue. Ce chapitre n'a pas pour objectif de discuter l'ensemble des rôles du NO que l'on peut trouver dans la littérature. Ces derniers étant extrêmement complexes et souvent controversés. Il s'agit ici, d'illustrer par quelques exemples comment le NO peut participer à l'inflammation ainsi que le rapport entre la cinétique de production du NO, et ses éventuels rôles dans l'inflammation.

Le NO et ses dérivés sont reconnus aujourd'hui pour jouer de multiples rôles dans l'inflammation. Ils sont souvent décrits comme des médiateurs de la réponse immunitaire non spécifique ayant à la fois des effets bénéfiques (bactéricides, cicatrisation) et délétères (cytotoxiques).

Figure 5: Effets du NO et de ces dérivés pouvant jouer un rôle dans l'inflammation



Nous avons vu dans les chapitres précédents que la diversité des effets du NO est liée à sa chimie complexe. Les différentes espèces chimiques dérivées du NO seront plus ou moins réactives et auront de ce fait, des cibles et des effets cellulaires différents. Nous avons aussi vu que le type de dérivé produit (et donc les cibles) dépendait de la cinétique de production et donc, de la source de production de NO (voir Figure 5). En effet, les NOSc produisent, pendant quelques secondes, des quantités relativement faibles de NO plutôt sous forme radicalaire, tandis que les NOSi sont à l'origine de la production continue d'une grande quantité de NO susceptible de former des NOx et du peroxy-nitrite.

Les faibles quantités de NO[•] produites par les NOSc, dans les cellules endothéliales, via leur activation des guanylates cyclases et l'augmentation de GMPc dans les cellules musculaires lisses vont entraîner une vasodilatation et augmenter la perméabilité vasculaire. Le NO[•] provenant des NOSc peut aussi réguler l'activation des PMN et des plaquettes, activer la prolifération des Lymphocytes T, et réguler la respiration cellulaire (10).

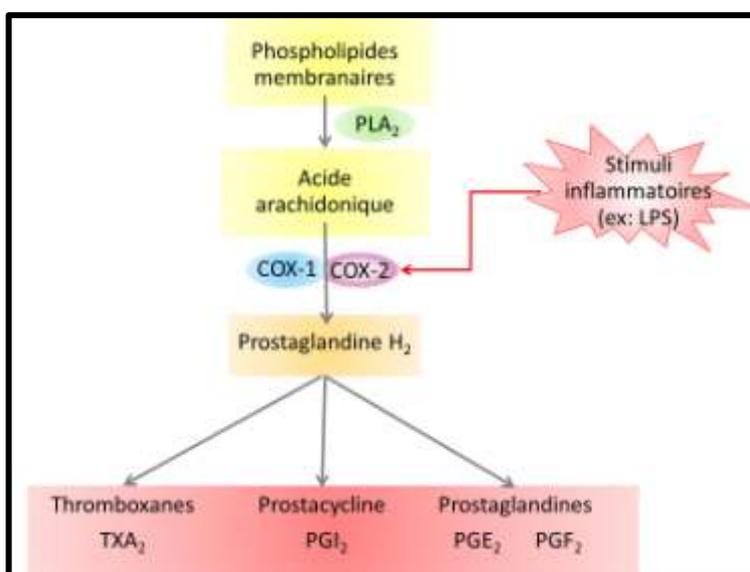
Au contraire, l'induction des NOSi au cours de l'inflammation, notamment dans les PMN et les Macrophages ou les cellules NK⁴, est à l'origine de grande quantité de NO[•]. Les espèces chimiques formées et les effets qui en découlent seront très différents de ceux observés avec le NO produit par les NOSc. Outre les dérivés dits auto-oxygénés du NO (NOx), la production simultanée et adjacente d'ion superoxyde par ces mêmes cellules inflammatoires génère la formation de peroxy-nitrite, à l'origine d'effets bactériotoxiques mais aussi cytotoxiques. Notamment, ce dernier participe à l'apparition d'un stress oxydatif, génère des modifications délétères de l'ADN (oxydation des guanines), entraîne la formation de nitrotyrosine, inhibe de manière irréversible la respiration mitochondriale, et peut ainsi induire la mort des cellules environnantes par nécrose ou apoptose⁵. Rappelons que les NOx peuvent être à l'origine de réactions de nitrosylation (addition d'un groupement –NO) des groupements thiols (SH) et amines (NH₃) protéiques. Le peroxy-nitrite peut aussi entraîner des modifications protéiques via réactions de nitration (addition d'un groupement –ONO) des résidus tyrosines. Les dérivés du NO produits par les NOSi sont ainsi capables d'activer ou d'inactiver de nombreuses protéines, telles que des kinases ou des facteurs de transcription⁶, impliquées dans diverses signalisations intracellulaires participant aux fonctions immunitaires. C'est, en effet, au travers de tels mécanismes que le NO peut modifier la sécrétion de

4, 5 et 6 Voir définition dans lexique

cytokines, agir sur la prolifération de certaines cellules inflammatoires, ou encore initier des processus apoptotiques.

Ces modifications protéiques peuvent aussi influencer la réponse immunitaire en contrôlant l'activité d'enzymes impliquées dans l'inflammation. Ainsi, il a été montré que la NOSi était capable de se lier, de nitrosyler et d'activer une autre enzyme inductible, impliquée dans la réponse inflammatoire, la cyclooxygénase-2 (47). Les cyclooxygénases sont des complexes enzymatiques permettant de convertir l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ (PGH₂), le précurseur de tous les prostanoides (voir schéma ci-dessous), jouant de nombreux rôles dans l'inflammation.

Figure 6: Rôle des Cyclooxygénases: Synthèse des prostanoides



Plus récemment, une autre équipe a montré qu'une S-nitrosylation permettait aussi l'activation d'une autre enzyme impliquée dans la synthèse des prostanoides, la phospholipase A₂ (87).

Le NO et ses dérivés sont susceptibles d'intervenir dans de nombreuses fonctions cellulaires participant au processus inflammatoire et immunitaire. Il n'est donc pas étonnant de trouver de multiples études s'intéressant aux rôles du NO dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques.

V. NO et inflammation parodontale:

V-1. Rappels sur l'inflammation dans les parodontites (25,52)

Les parodontites sont des maladies inflammatoires chroniques d'origine infectieuse et multifactorielle caractérisées par une destruction des tissus parodontaux pouvant aboutir à la perte des dents.

La pathogénèse de ces maladies est complexe et fait intervenir de nombreux mécanismes encore mal élucidés.

Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait définir de nouvelles cibles pharmacologiques et permettre d'améliorer la prise en charge des patients atteints de parodontite.

Sans être exhaustifs, nous décrivons ici brièvement, la réponse inflammatoire présente lors des parodontites en nous limitant à citer spécifiquement les éléments qui sont en rapport avec le sujet de cette thèse.

V-1-A L'inflammation parodontale

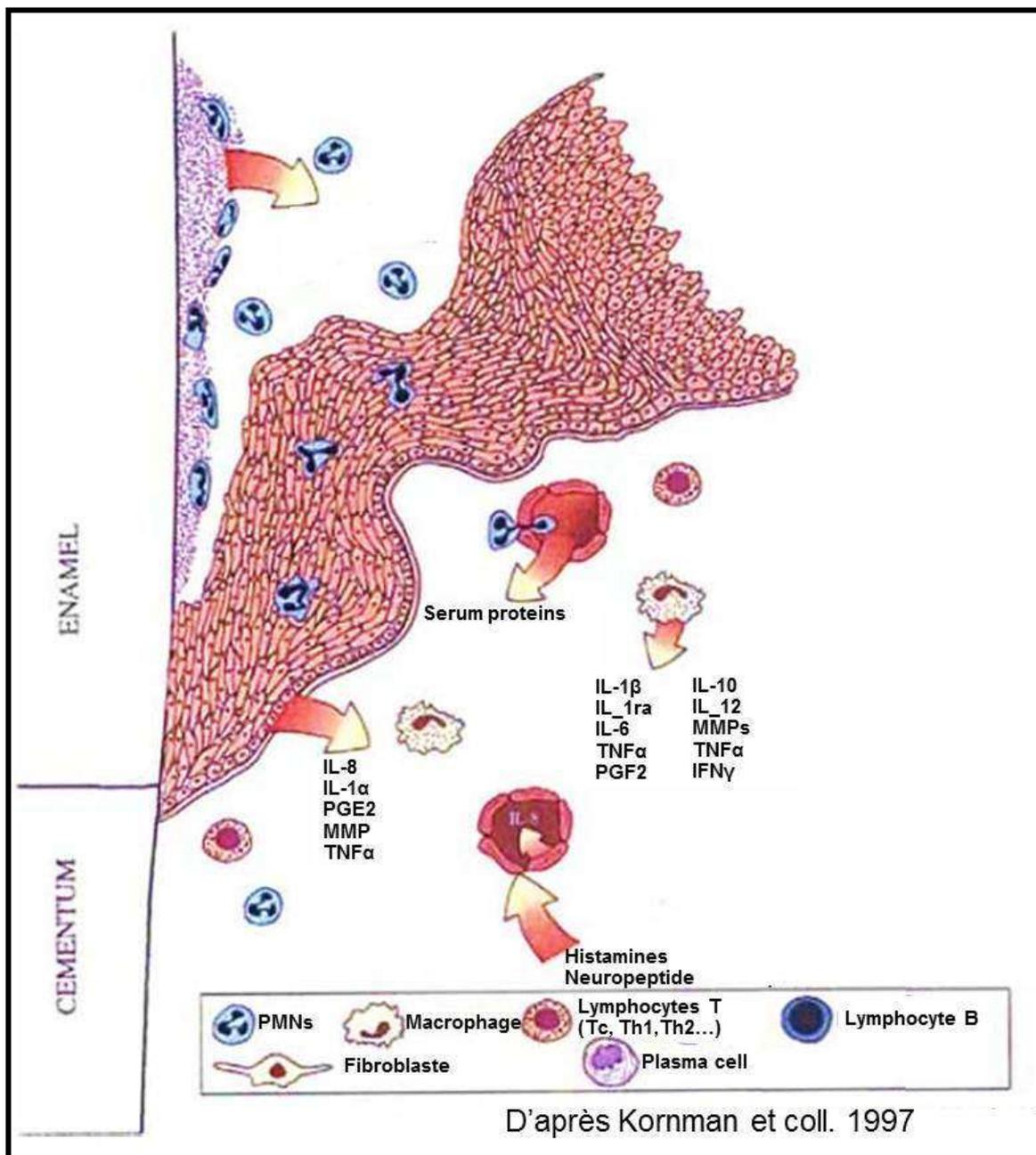
Le processus inflammatoire parodontal est initié par certains produits sécrétés par les bactéries de la plaque dentaire ou issus de leur dégradation, tels que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram- parodontopathogènes. Ces produits activent les cellules de la jonction épithéliale qui sécrètent alors de nombreuses cytokines dites pro-inflammatoires dont IL-8, IL-6, IL-1 β , Prostaglandine E2 (PGE2), TNF α ainsi que des métalloprotéases (MMP). Ces cytokines vont entraîner une cascade d'évènements dont une augmentation de la perméabilité vasculaire, la libération de médiateurs chimiotactiques permettant le recrutement au niveau du site inflammatoire des cellules immunitaires circulantes. Les polynucléaires neutrophiles (PMN) sont les premières cellules recrutées, suivies par les monocytes macrophages, toutes deux actrices de la réponse immunitaire dite non spécifique ou innée. Outre leur fonction bien connue de phagocytose, ces 2 types cellulaires, une fois activés produisent des cytokines et des médiateurs bactériotoxiques et participent ainsi à la progression de l'inflammation et à l'élimination des agents pathogènes. Les lymphocytes T et B arriveront sur le site dans un deuxième temps et participeront à la réponse immunitaire dite spécifique. La figure 7, montre les cellules présentes et les principales cytokines sécrétées lors de l'inflammation parodontale.

Cette réponse immunitaire extrêmement complexe a pour objectif d'éliminer l'agent agresseur et empêcher qu'il envahisse l'organisme. Dans certains cas, l'objectif est parfaitement rempli,

et l'inflammation se résout rapidement. La persistance des agents pathogènes et/ou l'influence de facteurs environnementaux et génétiques, via de mécanismes encore mal élucidés, peuvent empêcher la résolution de cette inflammation et entraîner son passage à la chronicité.

Les médiateurs de l'inflammation, alors présents de façon constante dans les tissus parodontaux vont entraîner leur dégradation.

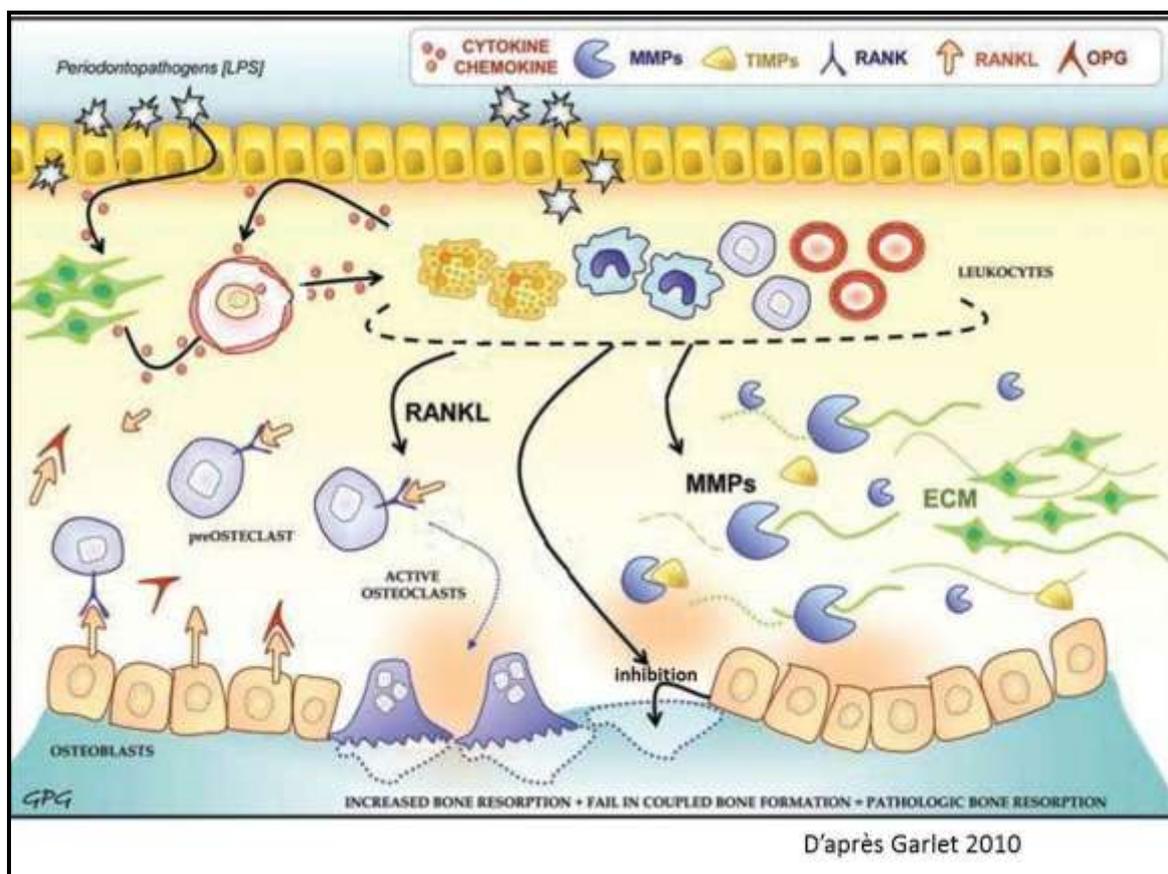
Figure 7: Principaux acteurs de l'inflammation parodontale



En situation normale, l'homéostasie osseuse est régulée et permet un équilibre entre la résorption osseuse induite par les ostéoclastes et la formation d'os assurée par les ostéoblastes. RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B Ligand) est une protéine capable d'activer la résorption osseuse en se liant au récepteur membranaire RANK (receptor activator of nuclear

factor- κ B) des préostéoclastes et des ostéoclastes, induisant ainsi leur différenciation en ostéoclastes actifs. RANKL peut aussi se lier à une protéine soluble l'ostéoprogénérine (OPG). Cette liaison RANKL/OPG agit comme un leurre et inhibe de manière compétitive la liaison de RANKL avec RANK. La résorption osseuse est donc sous le contrôle du rapport RANKL/OPG.

Figure 8: Inflammation parodontale et dommages tissulaires



Lors de l'inflammation, les leucocytes activés produisent ou induisent la production de RANKL par les cellules environnantes. Le rapport RANKL/OPG est augmenté et la résorption osseuse activée. En outre, les médiateurs de l'inflammation interfèrent aussi avec la formation osseuse induite par les ostéoblastes, contribuant ainsi à favoriser la résorption osseuse caractéristique des maladies parodontales.

De la même manière, l'homéostasie de la matrice extracellulaire (ECM) est finement régulée en situation normale. Les métalloprotéases matricielles (MMPs) constituent une famille d'enzymes capables de dégrader la matrice. Leur activité peut être inhibée par des protéines endogènes, les TIMP (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease). Dans un tissu parodontal sain, l'expression contrôlée de ces deux familles de protéines régule le remodelage matriciel physiologique.

Au contraire, la production importante de MMP lors d'une inflammation persistante modifie le rapport MMP/TIMP et favorise la dégradation de la matrice des tissus parodontaux et la résorption osseuse.

L'inflammation présente dans les parodontites est donc à l'origine de profonds dommages tissulaires et de la résorption osseuse.

V-2.Participation du NO dans l'inflammation parodontale: Les données *in vivo*

Nous ne détaillerons pas ici les études *in vitro* s'intéressant au rôle du NO dans l'inflammation parodontale. Notons simplement que certaines de ces études ont permis de montrer que des cytokines produites lors de l'inflammation parodontale (IL-1 β , TNF α , IFN γ) entraînent une induction de NOSi dans les cellules d'origine gingivale (15) et que des bactéries parodontopathogènes telles que Porphyromonas gingivalis (Pg) ou Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) sont capables d'induire la synthèse de NO dans des macrophages en culture (9,80).

Nous verrons que les bases de la participation du NO dans les maladies parodontales s'appuient sur 3 constats: 1) La production de NO est augmentée au cours de l'inflammation parodontale 2) l'inhibition de la production du NO dans des modèles de parodontite modifie la progression et les conséquences de l'inflammation parodontale 3) L'application contrôlée de NO, à l'aide de donneur de NO, diminue l'inflammation parodontale et les dommages tissulaires consécutifs.

V-2-A Augmentation de la production de NO dans les maladies parodontales

L'augmentation de la production de NO dans les parodontopathies est démontrée de manière plus ou moins directe : soit en mesurant l'augmentation d'expression ou d'activité des NO synthases (NOS) soit en mesurant directement le NO produit par différentes techniques.

a- NOSi :

Plusieurs études immunohistochimiques réalisées à l'aide d'anticorps anti NOSi, ont montré une augmentation de la quantité de NOS inductible dans les maladies parodontales.

Ainsi, Lohinai et coll. (60) dans une étude immunohistochimique réalisée sur des modèles de parodontite induite par ligature chez la souris ont conclu qu'après 8 jours de ligature, le nombre de cellules exprimant NOSi était augmenté⁷ dans les tissus ligaturés par rapport aux tissus témoins, les cellules positives étant principalement, les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes et PMN) et les kératinocytes. Aucune mention n'est faite sur la manière dont ils ont réalisé cette quantification sur les coupes histologiques. Ils ont cependant mesuré l'activité de la NOSi dans les tissus mucogingivaux: cette activité était jusque 3 fois plus importante dans les tissus ligaturés que dans les tissus témoins (dent controlatérale non ligaturée ou animaux témoins).

Dans une étude clinique réalisée à partir de biopsies provenant de 11 témoins, 9 patients atteints de gingivite et 15 patients atteints de parodontites, Ozer et coll. (70) ont montré que le nombre de cellules positives pour la NOSi (NOSi+) était augmenté dans les coupes provenant des groupes gingivites et parodontites, et diminué après un traitement parodontal de phase I (détartrage + surfaçage à l'aveugle).

A la lumière de ces 2 études, il semble que la quantité de NOSi soit augmentée au sein des tissus parodontaux lors des maladies parodontales. Cependant, peu d'éléments nous permettent de conclure qu'il y ait une induction de la NOSi, cette augmentation de marquage pouvant être le seul résultat de l'augmentation des cellules inflammatoires et non de la quantité d'enzyme par cellule.

L'étude de Batista et coll. (5) permet d'apporter un élément de réponse à cette question. Ils ont réalisé une étude clinique sur des biopsies provenant de 13 patients témoins, 19 patients atteints de gingivites et 19 patients atteints de parodontites. Le comptage des cellules inflammatoires (total et proportion relative des différents types cellulaires) et des cellules NOSi+ leur a permis de comparer : 1) le nombre de cellules NOSi+ dans les différents groupes, 2) le rapport du nombre de NOSi+ sur le nombre total de PMN, 3) le rapport du nombre de cellules NOSi+ sur le nombre de NOSi- au sein des PMN. Ils montrent ainsi que le nombre de cellules NOSi+ et le rapport NOSi+/total PMN est augmenté dans les maladies parodontales par rapport aux témoins. Cette donnée suggère une augmentation de la quantité de NOSi et donc une induction de NOSi au sein même des PMN.

Il est intéressant de noter qu'il n'y avait pas de différence significative entre les gingivites et les parodontites (nombre NOSi+ totale et rapport NOSi+/ PMN). Les auteurs en concluent

⁷ Chaque fois que nous parlerons « d'augmentation », de « diminution » ou de différence entre deux groupes étudiés, cela signifie que ces différences sont significatives. Dès lors que ces différences ne sont pas significatives, nous considérerons que les 2 groupes n'ont pas de différence.

que le degré d'atteinte de la maladie parodontale n'est pas déterminé par la quantité de NOSi (donc de NO) mais plutôt par la durée pendant laquelle l'enzyme est présente et active.

Notons aussi que d'après les auteurs, bien que tous les types de cellules immunitaires présentaient un marquage, seuls les PMN étaient colorés de manière très intense suggérant qu'ils sont les principales cellules exprimant la NOSi lors d'une inflammation parodontale.

Une quatrième étude clinique sur l'expression de la NOSi dans les maladies parodontales montre des différences avec les études précédentes. Lappin et coll. (55) ont en effet réalisé une étude sur des biopsies de 5 patients témoin et 16 parodontites. Cette étude diffère des travaux précédemment cités principalement du fait que les auteurs ont utilisé un co-marquage des coupes avec un anticorps monoclonal anti NOSi-humaine et un anticorps spécifique des macrophages (cd68). La co-localisation des deux marquages leur permet de conclure de manière probante que les macrophages expriment la NOSi. Ils montrent en outre que le nombre de macrophages était augmenté dans les parodontites ainsi que le nombre de leucocytes NOSi+. De plus, ils observent un marquage des cellules endothéliales dans les échantillons provenant des patients atteints de parodontite mais pas dans les tissus témoins. Au contraire des autres études, ils n'observaient pas de marquage des kératinocytes et seulement très peu de PMN et de lymphocytes était NOSi+. Les auteurs expliquent cette différence par l'utilisation d'un anticorps monoclonal plus spécifique que les anticorps polyclonaux utilisés dans les autres études.

De la même manière, Kendall et coll. ont travaillé sur des échantillons tissulaires provenant seulement de 3 patients témoins et 6 parodontites (44). En accord avec les autres études, les auteurs observaient aussi un marquage NOSi+ intense des infiltrats inflammatoires des tissus provenant des patients atteints de parodontite. Ce marquage était quasi absent dans le conjonctif des tissus témoins. De manière intéressante, ils ont aussi isolé et mis en culture des fibroblastes provenant des différents groupes puis réalisé un immuno marquage avec le même anticorps anti NOSi. Ils montrent ainsi que seuls les fibroblastes provenant des parodontites exprimaient de manière importante la NOSi, les fibroblastes isolés à partir de tissus témoins n'étant que très faiblement marqués.

Une dernière étude immunohistologique suggère que les traitements parodontaux entraînent une diminution de la quantité de NOSi dans les tissus gingivaux (27). Les biopsies étudiées provenaient de sites présentant une perte d'attache \geq à 7mm chez 13 patients atteints de parodontite chronique avant et 2 mois après traitement par surfaçage ou par lambeau de Widman modifié. D'après Güllü et coll., sur toutes les coupes, les PMN, les lymphocytes et les macrophages présentaient un marquage intense de la NOSi. Les cellules endothéliales

étaient, elles aussi, marquées mais de manière moins intense. Enfin, les auteurs ont aussi pu noter un faible marquage de la NOSi dans les fibroblastes et les kératinocytes. D'après les auteurs, la quantification du nombre de cellules NOSi+ et de l'intensité de marquage montrait que la quantité de NOSi était plus importante dans les biopsies présentant un infiltrat inflammatoire important. Cette étude suggère, en outre, que les traitements parodontaux diminuent le nombre de cellules inflammatoires mononuclées, de fibroblastes, de cellules endothéliales et de kératinocytes exprimant la NOSi. Plus globalement les auteurs concluent que l'intensité de l'expression de NOSi diminue après thérapie parodontale.

L'ensemble de ces études s'accordent à montrer une augmentation de la quantité de NOSi dans les tissus inflammatoires des patients atteints de maladie parodontale. En revanche, ces études divergent sur les types cellulaires exprimant cette NOSi. Les différences dans les techniques de fixation et d'inclusion, les anticorps utilisés ou encore les méthodes de comptage et d'analyse pourraient expliquer ces différences. De plus, le choix des sites de prélèvement mais surtout les critères d'inclusion des patients sont assez hétérogènes et peu précis dans certaines études ce qui pourrait aussi être à l'origine de ces divergences. Nous verrons par la suite qu'il est fondamental de connaître de manière claire les sources de production du NO. De nouvelles études sont donc nécessaires pour préciser les types cellulaires exprimant la NOSi.

b- NOSc:

Toujours au travers d'une étude immunohistochimique réalisée à partir de biopsie de tissu parodontaux, Artese et coll. (3) se sont intéressés à l'expression des NOS constitutives (NOS endothéliale et NOS neuronale) chez des patients témoins (n=7) et des patients atteints de parodontites chroniques (n=14) et agressives (n=6). Il est à noter que les biopsies étaient réalisées après un traitement de phase I (détartrage+ surfaçage à l'aveugle).

Ils ont ainsi observé un marquage NOSc+ au niveau de l'épithélium et des cellules endothéliales vasculaires. L'évaluation de l'intensité globale de marquage des NOSe et NOSn montrait que l'expression de ces deux NOSc était augmentée chez les patients atteints de parodontites par rapport aux témoins et ce, de manière plus importante dans la forme agressive de parodontite que dans la forme chronique.

Ce résultat peut sembler contradictoire avec l'étude de Lohinai et coll. (60). Ces derniers ont en effet mesuré une activité des NOS constitutives diminuée au niveau des sites de ligatures sur des modèles de parodontite induite chez le rat. Ces résultats sont pourtant difficilement

comparables: il s'agit de 2 types de modèle d'étude différents (parodontite induite chez le rat/étude clinique chez l'homme), et l'un mesure l'expression d'une enzyme et l'autre son activité.

Cette contradiction peut aussi s'expliquer par les états inflammatoires probablement différents : rappelons, en effet, que dans l'étude de Artese et coll. (3), les mesures étaient réalisées sur des biopsies de patients ayant bénéficié d'un traitement parodontal de phase I pouvant être à l'origine de l'induction d'un processus de cicatrisation dans lequel les NOSc pourraient jouer un rôle.

D'autres études seraient donc nécessaires pour déterminer un profil d'expression et d'activité des NOSc dans les maladies parodontales.

c- Mesure indirecte du NO produit: méthode de Griess (nitrite)

S'il apparaît clairement que les enzymes permettant de synthétiser du NO sont présentes dans les tissus parodontaux et ce, de manière importante dans les tissus inflammatoires, il reste à déterminer si ces NOS sont actives dans ces tissus et, effectivement à l'origine de la production de NO. Dans le but d'évaluer cette production de NO, plusieurs auteurs ont cherché à mesurer par la méthode de Griess⁸, les nitrites (NO_2^-) dans la salive ou dans le sérum de patients atteints de maladies parodontales.

Plusieurs études mesurant la quantité de NO_2^- salivaire montrent une augmentation de ce métabolite dans la salive de patients atteints de parodontites (71,76).

Reher et coll. (76) ont ainsi mesuré la quantité de nitrite salivaire sur 3 groupes constitués de 10 patients chacun: Un groupe témoin, un groupe parodontite modérée (plus de 30% des sites avec profondeur de poche comprise entre 1 et 4 mm), et un groupe parodontite avancée (plus de 30% des sites avec profondeur de poche supérieure à 6mm). La concentration de nitrite salivaire était augmentée dans les parodontites par rapport aux témoins et était plus importante dans les parodontites avancées que dans les parodontites modérées.

Dans leur étude, Parwarni et coll. (71) ont mesuré le taux de nitrite dans la salive de 30 patients témoins, 30 patients atteints de gingivite et 30 patients souffrant d'une parodontite. Ils montrent que la quantité de NO était augmentée dans les gingivites et parodontites par

⁸ Voir définition lexicque

rapport aux témoins. De plus, le taux de nitrite salivaire était plus important dans les parodontites que dans les gingivites. La mesure des nitrites salivaires, 3 et 6 semaines après un traitement parodontal chez les patients atteints de gingivite (détartrage + polissage) et les patients atteints de parodontite (surfaçage chirurgicaux et non chirurgicaux) montre que tous les traitements parodontaux permettaient de diminuer les quantités de nitrite salivaire chez ces patients. Le taux de nitrite demeurait cependant toujours plus élevé que chez les témoins.

Ces résultats sont en désaccord avec une étude similaire qui montre, au contraire, une diminution de la quantité de nitrite dans la salive de patients atteints de parodontite (4). Cette dernière étude était réalisée sur 25 témoins, 25 patients atteints de parodontite agressive et 25 patients souffrant de parodontite chronique.

Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des méthodes de collection et de traitement de la salive différentes (stimulée ou non, après rinçage ou sans rinçage, avec ou sans centrifugation des échantillons, échantillons congelés ou non avant dosage...). En effet, toutes ces études mesurent par la méthode de Griess, le nitrite qui est le principal produit formé par l'oxydation de NO[•] en solution aqueuse. *In vivo*, le nitrite peut être oxydé en nitrate (NO₃⁻), plus stable. Les nitrates peuvent être de nouveau réduits en nitrite grâce à une enzyme appelée nitrate réductase. Les mesures faites du nitrite dans toutes ces études ne tiennent compte ni de l'oxydation éventuelle du nitrite en nitrate dans les conditions de prélèvement, ni de l'éventuelle présence de nitrate réductase dans la cavité buccale (Nitrate réductase bactérienne, par exemple). Un moyen simple de quantifier le nitrite et le nitrate aurait été de mesurer, toujours par la méthode de Griess, l'ensemble des nitrates par l'adjonction de nitrate réductase lors du dosage.

Il est évident qu'un dosage de nitrite/nitrate dans la salive de patients atteints de parodontite n'est pas en soi un bon moyen d'évaluer la quantité de NO produite par les seuls tissus parodontaux. Ces métabolites peuvent en effet provenir de la dégradation du NO produit par différentes sources (glandes salivaires, digestion, bactéries...). En revanche, la preuve d'une corrélation entre taux de nitrite/nitrate et maladie parodontale pourrait permettre de développer un outil diagnostique intéressant. Il est à noter que dans ces études les écart-type des moyennes de chacun des groupes étaient très élevés suggérant une variabilité interindividuelle importante ce qui pourrait poser problème pour une utilisation diagnostique.

Une autre approche, consiste à mesurer le nitrite et le nitrate dans le sérum. C'est ce qu'ont réalisé Menaka et coll. dans une étude publiée en 2009. La mesure du nitrate et du nitrite dans

le sérum de patients sains (n=30) ou atteints de parodontite chronique (n=30) montre une élévation du taux de ces métabolites du NO dans le sérum des patients atteints de maladies parodontales (64). Là encore, la variabilité interindividuelle était élevée. En outre, on peut supposer que toute inflammation, autre que parodontale, pourrait influencer sur cette valeur.

d- Mesure indirecte du NO produit: peroxynitrite et nitrotyrosine

Nous avons vu dans les chapitres précédents que la production simultanée du NO produit par la NOSi et de superoxyde lors de l'inflammation pouvait générer du peroxynitrite (ONOO-). La détection de 3-nitrotyrosine (produit de la nitration des tyrosines par le ONOO-) constitue un marqueur relativement spécifique de la production de ONOO- (72).

Dans une étude immunohistochimique réalisée à l'aide d'un anticorps anti-3-nitrotyrosine dans un modèle de parodontite induite chez le rat, Lohinai et coll. (61) montrent une augmentation de la formation de nitrotyrosine dans les tissus gingivaux lors de l'inflammation parodontale.

En effet, cette étude révèle que 8 jours de ligature entraînaient au niveau des tissus bordant la ligature, la formation de 3-nitrotyrosine au sein de l'infiltrat inflammatoire, un marquage pouvant être notamment détecté au niveau des PMN, des monocytes/macrophages et des lymphocytes. De manière intéressante, la présence de 3-nitrotyrosine était aussi détectée au niveau de l'épithélium et des fibres de collagène du ligament alvéolodentaire de la dent ligaturée. Bien que beaucoup plus faible, un marquage était aussi présent dans les tissus de la dent controlatérale utilisée comme témoin.

Les auteurs font remarquer que le profil de détection de 3-nitrotyrosine correspond au profil d'expression de la NOSi réalisé dans le même modèle dans l'étude de 1998 (voir plus haut). La co-localisation des nitrotyrosines et de la NOSi suggère que le NO produit par la NOSi est bien à l'origine de la formation de peroxynitrite et que ce dernier entraîne la nitration de protéines sur son lieu de production.

V-2-B Inhibition de la production NO lors d'inflammation parodontale

L'ensemble des études précédentes montrent clairement une augmentation de la synthèse de NO dans les tissus parodontaux lors des maladies parodontales. Afin de comprendre son rôle dans ces pathologies, plusieurs études ont cherché à inhiber la production de NO dans des modèles de parodontites induites.

a- Effet bénéfiques des inhibiteurs de NOSi

Une première approche permettant d'étudier le rôle joué par le NO produit par les NOSi consiste à utiliser un inhibiteur⁹ de NOSi dans des modèles de parodontite induite par ligature chez le rat.

Plusieurs travaux rapportent un rôle bénéfique des inhibiteurs de NOSi dans de tels modèles suggérant un rôle délétère du NO produit par la NOSi dans l'inflammation parodontale.

Ainsi, dans l'étude de Lohinai et coll. (60), l'injection intrapéritonéale d'un inhibiteur de NOSi, le mercaptoethylguanidine (MEG) entraînait une diminution de la perte osseuse et de la perméabilité vasculaire induite par 8 jours de ligature du collet de la première molaire mandibulaire chez le rat. Ce résultat suggère le rôle délétère d'une production importante de NO produit par les NOSi, pour les tissus parodontaux, lors des parodontites. Outre son action inhibitrice sur la synthèse de NO par les NOSi, le MEG est aussi reconnu comme un bon tampon (détoxifiant) du peroxy-nitrite ONOO-, ce qui pourrait aussi expliquer son action protectrice dans ce modèle. Les effets bénéfiques de cet inhibiteur pourraient aussi être attribués à son action inhibitrice de la COX2 aussi impliquée dans l'inflammation parodontale.

Dans le même type d'étude, Di Paola et coll. (20) rapportent aussi des effets bénéfiques, dans l'inflammation parodontale, de l'inhibition de la production de NO par un autre inhibiteur relativement spécifique de la NOSi, l'aminoguanidine. Ils montrent, en effet, que l'induction d'une parodontite par ligature entraînait des dommages tissulaires, une augmentation de l'infiltration des neutrophiles (activité myéloperoxydase¹⁰), une augmentation de stress oxydatif (peroxydation lipidique, PARP=Marqueur de dommages nucléaires), une augmentation de l'activité et de l'expression de la NOSi, de nitrotyrosine et une augmentation de perméabilité vasculaire (extravasation de bleu Evans) et de perte osseuse alvéolaire. L'administration intrapéritonéale d'aminoguanidine non seulement inhibait la synthèse et l'activité de la NOSi ainsi que la formation de peroxy-nitrite mais permettait aussi de diminuer l'ensemble des paramètres cités ci-dessus. Ces travaux suggèrent, de nouveau, que le NO produit en forte quantité par le NOSi participe à l'inflammation parodontale, est délétère pour les tissus et pourrait contribuer aux dommages tissulaires observés dans les parodontites.

⁹ Les inhibiteurs utilisés dans ces études sont plus ou moins spécifiques de la NOSi. Certains comme le L-NAME ne sont pas spécifique de la NOSi et inhibe aussi la NOSc. D'autres, bien que plus spécifiques peuvent aussi à certaines concentrations inhiber la NOSc.

¹⁰ Voir définition dans lexique

Leitão et coll. (57) ont confirmé ces résultats dans un autre modèle de parodontite expérimentale induite par ligature chez le rat. En effet, l'injection intrapéritonéale d'aminoguanidine, là encore, permettait d'inhiber la perte osseuse induite par 11 jours de ligature. De la même manière, l'administration intrapéritonéale d'un inhibiteur compétitif des NOS, cette fois non spécifique de la NOSi, le L-NAME, diminuait la perte osseuse. Ces effets protecteurs sont reversés par la co-administration du substrat des NOS, la L-arginine. Ces données suggèrent que l'activité NOSi et donc la production de NO par cette enzyme est impliquée dans les dommages osseux induits par la ligature.

De manière intéressante, la détermination de la formule leucocytaire à différent temps (6h, 1, 7 et 11 jours) après la ligature montre une augmentation du nombre de leucocytes à 6h, 7 et 11 jours correspondant au recrutement des PMN à 6h et des lymphocytes à 7 et 11 jours. Les 2 inhibiteurs de NOS entraînent dès 6h une inhibition du recrutement des leucocytes, inhibition prolongée et accrue jusque 11 jours. Là encore cet effet était reversé par l'administration de L-arginine. Ces travaux suggèrent que le NO produit par les NOSi jouerait un rôle dans le recrutement des cellules inflammatoires au niveau du site de l'inflammation et participerait aux dommages tissulaires et plus particulièrement à la perte osseuse, lors de l'inflammation parodontale.

Plus récemment, les travaux de Herrera et coll. (33) ont confirmé que l'administration péritonéale d'aminoguanidine empêchait la perte osseuse induite par 11 jours de ligature chez le rat.

L'ensemble de ces études réalisées chez l'animal s'accordent à conclure à des effets bénéfiques de l'utilisation d'inhibiteur lors d'inflammation parodontale. A première vue, ces travaux peuvent paraître encourageants, et laisser présager la possibilité d'une utilisation thérapeutique de tels inhibiteurs, chez l'homme, pour traiter les maladies parodontales. Il faut rester pourtant extrêmement prudent en prenant en compte les limites de ces études.

Nous avons vu que le NO produit par les NOS constitutives avait de multiples rôles physiologiques vitaux. Pour éviter tout effet systémique dangereux, l'utilisation à des visées thérapeutiques d'un inhibiteur de NOSi devra donc s'affranchir de toute inhibition même partielle des NOS constitutives (Alderton 2001). Les inhibiteurs utilisés dans les études précédentes, y compris les inhibiteurs dits spécifiques, ont en réalité une spécificité relativement faible et peuvent aussi, à certaine concentration, inhiber les NOSc. Leur utilisation serait donc risquée. On peut déplorer, de ce fait, l'absence de mesure d'activité des NOS constitutives dans ces études. Il existe des inhibiteurs extrêmement spécifiques de la NOSi, tel que le GW274150. Ce dernier a d'ailleurs été testé chez l'homme dans une maladie

à composante inflammatoire: l'asthme (81). De manière intéressante, le GW274150 dans cette étude entraînait bien une diminution de la production de NO chez des patients asthmatiques mais s'est avéré n'avoir aucun effet sur la réponse inflammatoire induite par un allergène chez ces patients. Le GW274150 avait montré des résultats pourtant prometteurs dans des modèles animaux d'inflammation pulmonaire. Ceci démontre bien que l'extrapolation à l'homme de données tirées de modèles animaux n'est pas toujours possible. Pour autant, il serait intéressant d'étudier l'effet de tels inhibiteurs dans des modèles expérimentaux de parodontite chez l'animal et dans un deuxième temps, s'il s'avère protecteur, chez l'homme.

Cependant, dans toutes ces études, les inhibiteurs de NOS étaient administrés par injection péritonéale, ce qui augmente le risque d'effets systémiques. Pour diminuer ce risque, il serait probablement plus judicieux de les administrer localement (par injection gingivale par exemple). Il n'existe pas d'étude qui évalue les effets de l'injection locale de ces inhibiteurs sur l'inflammation et la résorption osseuse dans des modèles d'inflammation parodontale. De telles études seraient nécessaires, car il n'est pas à exclure que ces inhibiteurs appliqués localement aient des effets différents de ceux observés lorsqu'ils sont administrés par injection intrapéritonéale. En effet, Paul-Clark et coll. (73), ont montré dans un modèle d'inflammation pleurale induite chez le rat, que l'administration d'inhibiteurs de NOS qu'ils soient spécifiques ou non, au niveau du site de l'inflammation, exacerbait la réponse inflammatoire. Au contraire, leur administration systémique par voie intrapéritonéale améliorait la sévérité de l'inflammation.

Il est aussi regrettable que ces études n'aient pas cherché à administrer les inhibiteurs à différents stades de l'inflammation (avant l'induction, ou après le recrutement des PMN...). De telles données pourraient permettre de mieux comprendre le rôle du NO dans le processus inflammatoire des parodontites et définir des fenêtres d'inhibition de la NOSi plus ou moins bénéfiques. En outre, dans la mesure où ces inhibiteurs auraient un effet bénéfique sur l'inflammation parodontale une fois que cette dernière est installée, cela permettrait d'ouvrir des possibilités thérapeutiques curatives de l'utilisation de ces inhibiteurs dans les parodontites.

b- Modèles murin NOSi-/-

Les quelques études réalisées sur des modèles de souris invalidées pour le gène de la NOSi (souris NOSi-/-), compliquent le schéma établi par les études pharmacologiques, à savoir, un rôle plutôt délétère de la NOSi dans l'inflammation parodontale. En effet, l'analyse d'études réalisées sur des souris NOSi-/- semble indiquer, au contraire, que l'absence de NO produit

par les NOSi serait délétère lors d'inflammation parodontale et augmenterait les dommages tissulaires et osseux.

◆ Effets sur l'inflammation

Dans un modèle d'infection sous cutanées par Pg utilisant une chambre d'inoculation, Gyurko et coll (29) avaient montré qu'à 10 jours, la fréquence et l'étendue des lésions cutanées étaient augmentées dans les souris NOSi^{-/-} par rapport au souris de phénotype sauvage (WT: wild type en anglais). Le nombre de Pg provenant du fluide récolté dans la chambre, était plus important dans les souris NOSi^{-/-} que dans les WT. L'ensemble de ces données suggèrent que l'absence de NOSi entrainerait une aggravation de l'infection par Pg, avec une diminution de la clairance de la bactérie ainsi qu'une sévérité accrue des lésions.

Bien que le nombre de PMN dans le fluide provenant de la chambre à 11 jours restait comparable entre les 2 phénotypes, la proportion de PMN vivants était cependant diminuée dans les souris NOSi^{-/-} par rapport au WT. D'après les auteurs, l'absence de NO produit par les NOSi n'aurait donc pas d'impact sur la migration des PMN mais entrainerait un défaut de résistance à l'attaque bactérienne.

De manière intéressante, ils montrent que la capacité des PMN à produire de l'O₂⁻ sous stimulation est augmentée dans les NOSi^{-/-} par rapport au WT, ce qui d'après les auteurs pourrait en partie expliquer l'aggravation des dommages tissulaires induit par l'infection à Pg dans les souris NOSi^{-/-}.

La mesure de cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF α , IL-6) et de PGE2 dans le fluide provenant de la chambre d'inoculation après 1 et 3 jours montre qu'elles étaient produites dans les mêmes proportions chez les souris NOSi^{-/-} et les souris WT. La réponse humorale à Pg était elle aussi la même dans les 2 types de souris, la quantité d'IgG dans le sérum étant comparable dans les souris WT et dans les souris NOSi^{-/-}.

Le NO produit par les NOSi n'aurait donc que peu d'effet sur la réponse inflammatoire mais atténuerait les dommages contre l'hôte.

◆ Effet sur la résorption osseuse

De nombreuses études rapportent un rôle du NO dans l'homéostasie osseuse (85). Le NO pourrait donc aussi participer à la résorption osseuse observée dans les maladies parodontales. Les études sur des modèles NOSi^{-/-} s'intéressant au métabolisme osseux dans un contexte de parodontopathie sont relativement rare. On peut citer cependant 3 études pouvant être pertinentes en parodontologie.

- Modèle de parodontite apicale induite

Fukada et coll. (24) dans un modèle de parodontite apicale induite par infection bactérienne de la pulpe montrent que l'exposition à des bactéries de la pulpe entraînait la formation d'une lésion péri apicale après 21 jours chez les souris WT et NOSi^{-/-}. La lésion était plus étendue chez les souris NOSi^{-/-} et ces dernières, contrairement au souris WT, développaient un abcès orofacial. Le NO produit par les NOSi atténuerait donc, la formation de lésion périapicale et la résorption osseuse.

Afin de mieux comprendre ces différences, les auteurs ont cherché à caractériser et quantifier les cellules dans la région périapicale ainsi que les facteurs influençant la résorption osseuse: à savoir le nombre d'ostéoclastes par mm² d'os et l'expression de facteurs induisant la résorption osseuse (RANK, RANKL, SDF-1 α /CXCL12) ou au contraire inhibant cette résorption (OPG). Ils montrent ainsi que le nombre d'ostéoclastes est augmenté dans les lésions périapicales des souris NOSi^{-/-} par rapport au WT témoin. De plus, l'expression de RANK et SDF-1 α /CXCL12 était augmentée et l'expression de OPG diminuée dans les souris NOSi^{-/-} par rapport aux souris WT. L'ensemble de ces données impliquerait que le NO produit par les NOSi diminuerait les facteurs favorisant la résorption osseuse dans le contexte de pathologies périapicales d'origine bactérienne.

- Modèles d'infection orale par Pg: 2 études contradictoires

Alayan et coll. (1) montrent qu'une infection orale par Pg entraînait, après 10 semaines, une perte osseuse alvéolaire plus importante chez les souris NOSi^{-/-} que chez les souris de phénotype sauvage (WT), suggérant un rôle protecteur de la NOSi face à une infection orale induite par une bactérie parodontopathogène. La perte osseuse liée à l'âge était évaluée en mesurant la surface d'os résorbé à 6, 16 et 30 semaines dans les 2 types de souris, en l'absence d'infection orale par Pg. Les résultats obtenus montraient qu'il n'y avait pas de différence entre les 2 phénotypes.

En outre, ils montrent qu'une inoculation sous-cutanée de Pg entraînait des lésions là encore, plus importantes après 1 jour, chez les souris NOSi^{-/-} que chez les souris WT. A 10 jours, l'étendue des lésions était comparable dans les 2 phénotypes. L'histologie des lésions cutanées obtenues à 1 jour montrait une infiltration de PMN augmentée dans les souris NOSi^{-/-} par rapport au souris WT.

Une étude apparemment très comparable réalisée par Gyurko et coll. (30), rapportait pourtant des résultats opposés. Dans cette étude, l'infection orale par Pg entraînait, après 6 semaines, une perte osseuse alvéolaire chez les souris WT mais pas chez les souris NOSi^{-/-}.

Ils ont aussi mesuré la perte osseuse à 3, 6, 9 et 14 semaines, en l'absence d'infection par Pg. Ils montrent ainsi que la résorption osseuse à 14 semaines était significativement plus importante dans les souris NOSi^{-/-} que les souris WT, suggérant un rôle protecteur de la NOSi dans la résorption osseuse liée à l'âge.

La perte osseuse induite par Pg dans les souris WT est peu importante dans les 2 études. En revanche, dans l'étude d'Alayan, le Pg entraînait une résorption osseuse environ 2,5 fois plus importante chez les souris NOSi^{-/-} que chez les souris WT alors qu'il n'y avait pas de différence entre les 2 phénotypes dans l'étude de Gyurko. Parmi les hypothèses permettant d'expliquer les résultats contradictoires entre ces 2 études, on notera essentiellement la différence de temps d'analyse: quatre semaines plus tard dans l'étude d'Alayan. Il est à noter aussi que dans l'étude d'Alayan, l'infection par Pg était précédée par un traitement antibiotique, ce qui n'est pas le cas dans l'étude de Gyurko. Une différence de virulence des souches bactériennes pourrait aussi apporter une explication.

Notons aussi que les deux études ne trouvent pas les mêmes résultats quant à la résorption osseuse liée à l'âge: l'absence de NOSi n'ayant pas d'effet sur cette résorption dans l'étude d'Alayan alors que Gyurko et coll. rapportent une différence faible mais significative. La perte osseuse, dans l'étude de Gyurko, était évaluée en mesurant la distance entre la jonction émail-cément et la crête osseuse alvéolaire. Alayan et coll. mesuraient la surface d'os résorbé. La différence très faible observée par la mesure jonction émail-cément/ crête osseuse alvéolaire pourrait devenir non significative en terme de surface osseuse.

Bien que la majorité des quelques études réalisées sur des modèles de gènes invalidés pour la NOSi dans le cadre des maladies parodontales semblent pencher plutôt vers un effet protecteur de la NOSi, les résultats obtenus à partir de ces études sont insuffisants pour conclure de manière claire au rôle joué par la NOSi dans les parodontopathies.

De manière générale, il faut rester très prudent quant à l'extrapolation de données obtenues à partir de tels modèles KO, puisque bien souvent, l'invalidation d'un gène peut entraîner des modifications de développement et des adaptations à l'origine de biais dans les études rendant leurs résultats incompatibles avec une réalité physiologique chez l'homme.

Il aurait, par exemple, été intéressant de quantifier la production de NO dans ces modèles en analysant le statut des NOS constitutives par une analyse immunohistochimique ou en mesurant leur activité. Il aurait été aussi judicieux de comparer la présence de nitrotyrosine dans les 2 phénotypes. On peut en effet supposer que l'absence de NOSi puisse être, compensée par une production augmentée de NO par les NOSc ou d'autres mécanismes.

Il existe de nombreuses études s'intéressant au rôle du NO dans différentes maladies inflammatoires chroniques. Malgré un nombre d'études beaucoup plus important que dans le cadre des maladies parodontales, il n'en ressort pourtant pas de schéma clair: le NO étant tantôt protecteur, tantôt délétère (49).

Les nombreux rôles susceptibles d'être joués par le NO et ces dérivés, peut laisser penser qu'une inhibition totale et définitive de la NOSi ne donne pas une idée fine et claire des mécanismes cellulaires et physiopathologiques faisant intervenir le NO. Le NO produit par la NOSi n'est probablement pas délétère ou bénéfique à tous les stades de l'inflammation. En outre, la source cellulaire de production peut influencer sur les effets délétère/bénéfique (75).

Il existe aujourd'hui des techniques de transgénèse permettant de générer des souris mutantes chez qui l'invalidation conditionnelle d'un gène est possible. Chez ces souris, le gène d'intérêt peut être invalidé spécifiquement dans un tissu (invalidation spatiale) ou à un temps donné (invalidation temporelle). Très récemment, Jiang et coll. (41) ont généré des souris mutantes permettant une délétion conditionnelle de la NOSe. A notre connaissance, il n'existe pas, à ce jour, de tels mutants permettant le contrôle conditionnel de l'expression de la NOSi. De tels modèles animaux pourraient s'avérer pertinents pour étudier le rôle des NOS dans l'inflammation.

Dans l'objectif d'une application clinique visant à inhiber la production de NO par la NOSi, il est essentiel d'avoir une idée claire de où et quand, chaque dérivé du NO joue tel ou tel rôle afin d'établir une « fenêtre thérapeutique » d'inhibition de la NOSi. Les données de la littérature, aujourd'hui ne permettent pas de répondre à l'ensemble de ces questions.

V-2-C Effets protecteur des donneurs de NO

De nombreuses études montrent qu'un stress oxydatif est présent lors de l'inflammation parodontale et suggèrent qu'il participerait à la progression de l'inflammation et aux dommages tissulaires rencontrés lors des maladies parodontales (6, 12). Nous avons vu que le NO participe aux réactions d'oxydo-réduction intracellulaires et peut s'avérer à la fois pro- et antioxydant. De plus, les résultats parfois contradictoires des études précédentes révèlent le caractère biphasique du NO dans l'inflammation. Dans un tel contexte, augmenter la quantité de NO, de manière contrôlée, à l'aide de donneurs de NO pourrait influencer sur la progression de l'inflammation parodontale et sur les dommages tissulaires. Deux études ont cherché à évaluer les effets de l'application d'un donneur de NO dans des modèles de parodontite induite par ligature chez le rat.

Ainsi, Leitão et coll. (58) montrent que l'application locale d'un donneur de NO, l'isosorbide, sous forme de gel, 1h avant le placement de la ligature, puis 2 fois par jour pendant 11 jours,

entraînait une diminution significative de la perte osseuse observée chez les animaux non traités (aucun gel) ou n'ayant reçu que le vecteur (gel sans isosorbide). Dans ces deux derniers groupes, l'analyse histologique des tissus parodontaux dans la région de la ligature révélait la présence d'un infiltrat inflammatoire important associée à une destruction sévère du ciment et une résorption des procès alvéolaires. En revanche, dans le groupe traité par l'isosorbide, les auteurs observaient une diminution de l'infiltrat inflammatoire, une préservation partielle du ciment et des procès alvéolaires. Le NO semble donc protéger les tissus parodontaux des dommages associés à l'inflammation.

Cette étude purement descriptive, ne permet pas de déterminer par quel(s) mécanisme(s) le NO agit.

Une deuxième étude très récente réalisée dans le même modèle de parodontite expérimentale, permet d'apporter un début d'explication sur les effets bénéfiques de l'application de NO dans un tel modèle. En effet, De Menezes et coll. (17) ont évalué, sur différents paramètres, les effets d'un autre donneur de NO, le GSNO, administré par injection intragingivale 1h avant l'induction de la parodontite puis, quotidiennement. On peut regrouper les paramètres étudiés en 3 grands groupes: Les dommages tissulaires, l'inflammation et le stress oxydatif (voir tableau récapitulatif).

Les dommages tissulaires étaient évalués après 11 jours de ligature en mesurant la perte osseuse alvéolaire (analyse macroscopique et histologique), l'activité ostéoblastique (mesure de la phosphatase alcaline osseuse ¹¹) et l'expression, par immunohistochimie de métalloprotéases responsables de la dégradation du collagène matriciel (MMP1 et MMP8).

L'inflammation était examinée par l'estimation, 6 jours après l'induction de la parodontite, de l'infiltration des neutrophiles (activité myéloperoxidase: MPO), et 11 jours après, par le dosage de cytokines inflammatoires (IL-1 β et TNF α).

L'analyse de l'expression de la NOSi par immunohistochimie et le dosage des nitrites et nitrates, le dosage de malonaldehyde (MDA, marqueur de peroxydation lipidique) et de glutathion réduit (GSH) permettait d'évaluer le stress oxydatif.

De manière attendue, la mise en place de la ligature entraînait une augmentation des 3 grands groupes de paramètres étudiés, à savoir une augmentation de dommages tissulaires, de l'inflammation et du stress oxydatif.

L'injection intragingivale de GSNO (100nM) permettait de diminuer considérablement le stress oxydatif, l'inflammation et les dommages tissulaires induits par la ligature (voir tableau ci-dessous).

¹¹ Phosphatase alcaline rein foie os

Par contre, il est important de noter que l'administration de 500nM de GSNO n'améliorait que très peu, voire pas du tout l'ensemble des effets induits par la ligature, suggérant qu'il existe une concentration seuil au-delà de laquelle le GSNO n'a pas d'effet bénéfique. Ces données sont en accord avec d'autres études rapportant une action biphasique du NO et des donneurs de NO dépendante de leur concentration (56).

Figure 9: Tableau récapitulatif des résultats de l'étude de De Menezes et coll. (17)

			parodontite expérimentale (PE)	
			sans GSNO	avec GSNO (100nM)
			(par rapport à dent non ligaturée)	(par rapport à PE sans GSNO)
Dommages tissulaires	perte osseuse	Macro et microscopique	+	-
	activité ostéoblastique	phosphatase alcaline osseuse	-	+
	expression	MMP1	+	-
		MMP8	+	-
Inflammation	dosage	TNF α	+	-
		IL1	+	-
	activité	Myéloperoxydase	+	-
stress oxydatif	dosage	Malonaldéhyde	+	-
		GSH	-	+
		Nitrate nitrite	+	-
	expression	NOSi	+	-

L'administration d'un donneur de NO, le GSNO permet donc de protéger le parodonte des effets délétères de l'inflammation. Les mécanismes par lesquels le NO provenant du GSNO est bénéfique dans ce modèle restent à élucider. On peut néanmoins émettre quelques hypothèses. Les effets antiinflammatoires du GSNO se manifestent très précocement puisqu'une diminution de l'infiltration des PMN était observée dès 6h. Cette donnée suggère une inhibition du recrutement de ces cellules par le GSNO. D'autres études ont d'ailleurs montré que le NO était capable d'inhiber l'expression de molécule d'adhésion à la surface de l'endothélium et ainsi de diminuer le recrutement des leucocytes circulants au site inflammatoire (16).

La diminution du stress oxydatif pourrait s'expliquer par plusieurs phénomènes. De manière intéressante, cette étude montre que l'administration contrôlée de NO permet de diminuer la production endogène de grandes quantités de NO par les NOSi, susceptibles de former des espèces oxydantes et donc de participer à l'établissement d'un déséquilibre redox dans les tissus. En outre, la diminution de l'inflammation et donc de cellules inflammatoires capables de produire des espèces oxydantes diminuera forcément le stress oxydatif. Enfin, le NO peut aussi jouer un rôle antioxydant plus directement, notamment, en limitant la formation de peroxy-nitrite ou en réagissant avec certains radicaux très oxydants (86).

Les effets antioxydants et anti-inflammatoires du GSNO sont probablement une explication à son action protectrice sur les dommages tissulaires. Les effets du GSNO sur l'activité ostéoblastique suggèrent cependant que ce donneur de NO protège non seulement en diminuant la résorption osseuse mais aussi en permettant la formation osseuse.

Il est regrettable que les auteurs n'aient pas évalué les effets du GSNO sur les bactéries. On peut en effet, émettre l'hypothèse que le NO produit par le GSNO soit bactériotoxique et diminue, ainsi, l'infection bactérienne à l'origine de la réponse inflammatoire.

Ces deux études *in vivo* semblent indiquer qu'une approche pharmacologique visant à administrer de manière contrôlée du NO grâce à des donneurs pourrait s'avérer profitable dans le traitement préventif des parodontites. Bien évidemment, là encore, d'autres études sont à réaliser afin de confirmer ces données et de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces donneurs de NO agissent. En outre, il serait intéressant de vérifier si de tels donneurs pourraient aussi être bénéfiques s'ils sont administrés une fois l'inflammation installée.

V-3. Intérêt de l'étude du rôle du NO en parodontologie

L'ensemble de ces études démontrent que le NO et ses dérivés participent à l'inflammation parodontale. Ses rôles précis dans la pathogénèse des parodontites demeurent néanmoins confus et restent à déterminer. Une meilleure compréhension des mécanismes faisant intervenir le NO et ses dérivés dans ces pathologies pourrait permettre de définir de nouvelles cibles pharmacologiques et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients atteints de parodontite.

A ce jour, deux types d'approches pharmacologiques en parodontologie ont été étudiées et seulement dans des modèles animaux.

La première consiste à inhiber l'activité de la NOSi et donc du NO produit par cette enzyme. Malgré des résultats encourageants chez l'animal, une utilisation clinique chez l'homme des inhibiteurs de NOSi semble encore compliquée. En effet, cela supposerait l'emploi d'inhibiteurs hautement spécifiques, sur des périodes courtes, appliqués idéalement de manière locale pour éviter tout effet systémique délétère. Les données expérimentales jusqu'à présent sont loin d'avoir défini de telles conditions. Ces inhibiteurs constituent cependant d'excellents outils expérimentaux pour étudier le rôle du NO dans la pathogénèse des parodontites.

La deuxième approche repose sur l'application de donneur de NO. Seules 2 études existent dans des modèles de parodontites expérimentales chez l'animal et montrent un effet protecteur de ces donneurs. Là encore, d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats et pour définir les conditions idéales d'utilisation pour leur éventuel emploi lors des traitements préventifs et/ou curatifs des parodontites. L'avantage de certains de ces donneurs (par exemple l'isosorbide), notamment par rapport aux inhibiteurs de NOSi, est qu'ils sont

déjà communément utilisés dans le traitement de certaines pathologies cardiovasculaires et pulmonaires. Leurs effets systémiques sont déjà bien étudiés et leur utilisation chez l'homme, pour une éventuelle application en parodontologie, serait donc simplifiée. De plus, comme le montre l'étude de Leitão et coll. (58), une application topique sous forme de gel est possible et peut être envisagée dans le cadre d'une utilisation clinique en parodontologie en réduisant les risques d'effets secondaires systémiques toxiques. En outre, afin d'améliorer le potentiel thérapeutique de ces donneurs, de nombreuses recherches ont pour objectif de développer de nouveaux vecteurs permettant une production mieux contrôlée du NO dans le temps et dans l'espace (11,65).

L'étude du NO dans les parodontites présente un intérêt qui s'inscrit au-delà du domaine de la parodontologie. En effet, au cours des 20 dernières années, des études épidémiologiques ont montré qu'il existe une corrélation entre les maladies parodontales et plusieurs maladies systémiques, et notamment, les maladies cardiovasculaires et le diabète. Cette relation est bilatérale: Les maladies parodontales ont une influence délétère sur certaines maladies systémiques. De même, des pathologies générales peuvent aggraver l'évolution et la sévérité des parodontites (14,46). Une meilleure compréhension des mécanismes qui relient les maladies parodontales et les pathologies générales paraît essentielle à la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques visant à prévenir l'apparition et l'aggravation de multiples maladies systémiques. Pourtant, ces mécanismes restent à élucider. De manière intéressante, quelques études suggèrent que l'inflammation chronique présente dans les parodontites pourrait contribuer au dysfonctionnement des cellules endothéliales via une altération de la production de NO par ces cellules. Ce dysfonctionnement entraînerait un défaut de vasodilatation en réponse à des stimuli physiologiques et pourrait participer au développement de l'athérosclérose (35,36).

L'étude des rôles du NO en parodontologie pourrait donc aussi contribuer à élucider les mécanismes qui relient les maladies parodontales et les pathologies générales.

VI. NO et pulpe dentaire: les données de la littérature

VI-1. Bref rappel sur la pulpe dentaire (74)

La pulpe dentaire est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé et innervé. Sa particularité réside dans le fait qu'elle est contenue dans une enceinte rigide, la cavité pulpaire, qui lui assure une protection physique contre l'environnement oral riche en bactéries.

La partie périphérique de la pulpe, directement en contact avec la paroi dentinaire, est constituée par les corps cellulaires des odontoblastes, cellules post-mitotiques (donc incapable de se diviser) et hautement différenciées, spécialisées dans la formation de la dentine. Les odontoblastes sont organisés en palissades alignées le long de la dentine et projettent un prolongement cytoplasmique à l'intérieur des tubuli dentinaires.

La zone immédiatement sous-jacente est dépourvue de cellule mais riche en terminaison nerveuses sensibles et en capillaires sanguins. On trouve ensuite une zone de faible épaisseur riche en cellules (couche sous odontoblastique de Höhl) qui contient principalement des fibroblastes, des cellules dendritiques et des cellules mésenchymateuses indifférenciées (cellules de Höhl), ce sont des cellules issues de la dernière mitose des odontoblastes qui pourront se différencier en odontoblastes si les odontoblastes primaires sont détruits (voir chapitre VI-3-A b).

La partie centrale de la pulpe dentaire est constituée d'un tissu conjonctif classique composé d'une matrice extracellulaire contenant notamment: des fibroblastes, des cellules immunocompétentes (cellules dendritiques, macrophages...), des cellules mésenchymateuses indifférenciées et d'un réseau de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses.

La composition cellulaire de la pulpe lui permet d'assurer plusieurs fonctions fondamentales: La pulpe dentaire est en effet responsable de la formation de la dentine (odontoblastes) au cours du développement et de l'édification des dents, tout au long de la vie puis lors d'agression. Les réseaux vasculaires et nerveux lui confèrent des propriétés nutritives, nociceptives et proprioceptives essentielles au maintien des fonctions physiologiques de la dent. Enfin, elle est capable de mettre en place une réaction inflammatoire et assure ainsi un rôle de défense face aux agressions.

On comprend donc que le maintien de la vitalité pulpaire lors de soins dentaires soit aujourd'hui recherché (83). C'est pourquoi une parfaite connaissance de la physiologie et de la physiopathologie pulpaire est essentielle à la pratique odontologique ainsi qu'au développement de nouvelles techniques permettant de préserver la vitalité pulpaire.

Pourtant, nous verrons que certains mécanismes impliqués dans la régulation de la physiologie pulpaire, et notamment ceux faisant intervenir le NO restent à déterminer.

VI-2. Rôles physiologiques potentiels du NO dans la pulpe

Les études s'intéressant aux rôles du NO dans la pulpe dentaire sont relativement rares. Néanmoins, nous allons voir que le NO est bien présent dans la pulpe et qu'il pourrait contribuer à la régulation de fonctions physiologiques et physiopathologiques pulpaire.

VI-2-A Présence des NOS constitutives

a- NOS endothéliale:

La présence de NO dans la pulpe fut pour la première fois indirectement suggérée en 1993, par une étude histochimique de Kerezoudis et coll. (45) réalisée chez le chat et le rat. Ils montrent, alors la présence d'activité NADPH diaphorase¹² dans la pulpe dentaire de ces animaux, et plus précisément au niveau des odontoblastes et des cellules endothéliales des vaisseaux pulpaire. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que l'activité NADPH diaphorase correspondrait aux NO synthases.

Il faudra attendre 2000 pour qu'une étude menée par Felaco et coll. co-localise effectivement cette activité NADPH diaphorase avec la NOSe (22). En effet, dans cette dernière étude, l'analyse immunohistochimique de coupes réalisées à partir de pulpes humaines saines (n=20) révélait le marquage par un anticorps anti-NOSe des odontoblastes et des cellules endothéliales des vaisseaux pulpaire. La présence de NOSe était confirmée par la mesure de l'expression d'ARNm par RT-PCR¹³ et de la protéine par Western Blot¹⁴. Ces résultats furent ensuite validés par d'autres études réalisées chez l'homme (19) et chez le rat (50). La NOSe est donc exprimée dans la pulpe au niveau des odontoblastes et des cellules endothéliales.

b- NOS neuronale:

La présence de NOSn dans la pulpe fut d'abord suggérée lors d'une étude histochimique réalisée sur des pulpes disséquées chez le chat et le chien, par la localisation d'activité de NADPH diaphorase au niveau des fibres nerveuses pulpaire (62).

Dans une étude immunohistochimique plus récente, cette fois-ci réalisée sur des coupes déminéralisées de dents de rat, Korkmaz et coll. (50) ont pu localiser la présence de NOSn au niveau des odontoblastes et au niveau de leur prolongement odontoblastique. Ils montrent, en outre, que les fibres nerveuses pulpaire expriment de la NOSn.

Ces deux études suggèrent que le NO pourrait jouer un rôle dans la neurotransmission pulpaire.

¹² Aussi appelée NADPH déshydrogénase ou NADPH oxydoréductase : Regroupe toutes les enzymes capables de catalyser la réduction (ou l'oxydation) du NADP(H). Les NOS sont des NADPH diaphorases.

¹³ ¹⁴ Voir définition lexicque

VI-2-B Présence d'une signalisation dépendante du NO dans la pulpe dentaire

Les mécanismes responsables des rôles physiologiques du NO font classiquement intervenir le système guanylate cyclase soluble (GCs)/GMP cyclique (GMPc) (Voir chapitre III-2).

Dans leur étude de 2005 réalisée chez le rat, Korkmaz et coll. ont cherché à évaluer la présence, dans la pulpe, d'une signalisation GCs-GMPc dépendante du NO (50).

Rappelons que la guanylate cyclase est un hétérodimère c'est-à-dire qu'elle est constituée d'une sous unité α et d'une sous unité β .

Les auteurs ont dans un premier temps recherché, à l'aide d'anticorps spécifiques, l'expression dans la pulpe, des sous unités $\alpha 2$ et $\beta 1$ de la guanylate cyclase (respectivement notés GC $\alpha 2$ et GC $\beta 1$) ainsi que la production de GMPc.

Ils montrent ainsi la présence de GMPc, GC $\alpha 2$ et GC $\beta 1$ au niveau des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses pulpaire et des odontoblastes.

Rappelons que la NOSe et la NOSn sont aussi exprimées respectivement au niveau des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses de la pulpe. En outre, ces deux enzymes sont aussi présentes dans les odontoblastes. Ces données suggèrent la possibilité d'une signalisation GCs-GMPc dépendante du NO au sein de la pulpe.

Afin de vérifier si l'activité de la guanylate cyclase est bien dépendante du NO dans la pulpe, les auteurs ont ensuite évalué les effets sur la production de GMPc, d'un traitement *ex vivo* de la pulpe avec un donneur de NO, le spermine-NONOate ou avec un inhibiteur de NOS, le L-NAME. La quantification de l'intensité de l'immunomarquage du GMPc sur les coupes montrait une diminution significative de la quantité de GMPc au niveau des odontoblastes et des vaisseaux sanguins dans les pulpes traitées par le L-NAME par rapport aux pulpes non traitées. Au contraire, le traitement par le spermin-NONOate augmentait significativement le marquage de GMPc par rapport au control.

Cette étude suggère qu'il existe une signalisation GCs-GMPc dépendante du NO dans la pulpe et qu'elle pourrait réguler des fonctions physiologiques des vaisseaux sanguins, des fibres nerveuses et des odontoblastes du complexe dentino-pulpaire.

VI-2-C NO et circulation sanguine pulpaire

L'expression de la NOSe dans les cellules endothéliales des vaisseaux pulpaire ainsi que la présence de GMPc et de la GCs dans ces vaisseaux, laisse supposer que le NO participe à la régulation de la circulation sanguine pulpaire.

Quelques études se sont effectivement intéressées au rôle du NO dans cette régulation.

Dans une étude réalisée chez le chat, avant même que la présence de NOSe dans la pulpe ne soit confirmée, Lohinai et coll. (59) montrent que l'administration systémique d'un inhibiteur de la NOSe ou au contraire, d'un donneur NO, modifiaient des paramètres hémodynamiques pulpaire tels que le flux sanguin et la résistance vasculaire. Ces données suggèrent que le NO participe à la régulation de l'homéostasie vasculaire physiologique pulpaire. Cependant, cette étude ne permet pas de conclure que le NO agit localement.

Une étude plus récente (48) rapporte les effets de l'application, cette fois ci locale, d'un inhibiteur de NO sur le diamètre des artérioles pulpaire. Les auteurs montrent que l'inhibition des NOS par le L-NAME entraînait une diminution du diamètre des artérioles suggérant que le NO participe au maintien du tonus vasculaire pulpaire au travers de ses propriétés vasodilatatrices.

A notre connaissance, il n'existe pas, à ce jour, d'étude rapportant la participation du système GCs-GMPc dans la régulation locale de la circulation sanguine pulpaire.

De même, la participation du NO dans la neurotransmission pulpaire ou encore le rôle joué par la NOSe exprimée dans les odontoblastes demeurent encore indéterminés.

Une meilleure compréhension des rôles et des mécanismes faisant intervenir le NO dans la physiologie pulpaire pourrait être utile notamment lors du développement de nouvelles techniques d'odontologie conservatrice.

VI-3. NO et inflammation pulpaire

VI-3-A Réaction inflammatoire et complexe dentino-pulpaire

La pulpe présente la particularité d'être intimement liée à la couche dentinaire qui l'entoure, de telle sorte que tout traumatisme (thermique, chimique ou physique) ou toute infection bactérienne qui s'exerce sur la dentine pourra affecter la pulpe (74).

Comme tout tissu conjonctif, la pulpe répondra à ce type d'agression en initiant une réaction inflammatoire dont l'objectif est, idéalement, de neutraliser ou d'éliminer les facteurs d'agression et/ou d'initier les processus de réparation.

Pourtant, les conséquences d'une inflammation pulpaire ou pulpite sont diverses, puisqu'elle peut aboutir soit à une cicatrisation soit à une nécrose de la pulpe. La nature, la durée ou l'intensité de l'inflammation sont autant de facteurs qui pourront influencer sur le développement du processus inflammatoire et sur ses conséquences (8,34,66).

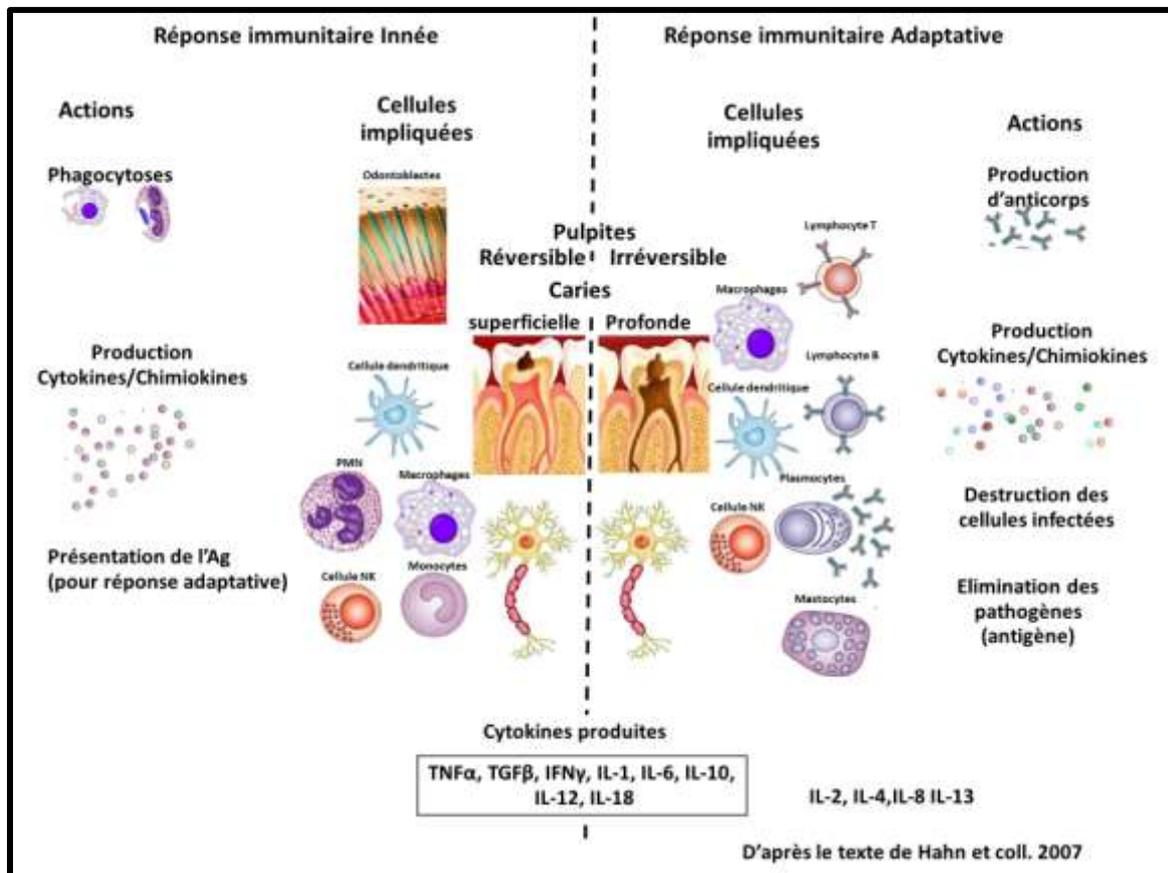
a- Lésion carieuses et pulpite (8,31,32)

La carie est la principale cause de d'inflammation pulpaire. La progression et l'intensité d'une pulpite va notamment dépendre de la vitesse de progression de la carie et de la distance qui la sépare de la pulpe.

Ainsi, lorsque la carie se développe lentement ou lorsque la carie est relativement superficielle et qu'un traitement a permis d'éliminer une grande partie des tissus dentaires infectés, la réaction inflammatoire peut parvenir à éliminer l'agent agresseur. En parallèle, les processus de réparation activés au cours de l'inflammation vont permettre aux odontoblastes de reformer de la dentine dite réactionnelle ou cicatricielle (voir chapitre suivant). L'inflammation se termine et la pulpe cicatrise, on parle alors de pulpite réversible. Au contraire, si la carie est profonde, l'inflammation progresse et évolue plus rapidement. Elle est inefficace contre l'agent agresseur et ne parvient pas à l'éliminer. La réaction inflammatoire alors exacerbée va entraîner de profonds dommages tissulaires et *in fine* la nécrose de la pulpe et la progression de l'infection dans les tissus périapicaux de la dent. On parle alors de pulpite irréversible.

De nombreuses cellules et médiateurs inflammatoires sont mis en jeu lors des pulpites (voir Figure ci-dessous).

Figure 10: Principales cellules et cytokines impliquées dans la réponse immunitaire de la pulpe



Comme toute réaction inflammatoire, une réponse immunitaire non spécifique ou innée sera mise en place dans un premier temps. Si l'agression persiste, ce qui est le cas lors de lésions carieuses profondes, l'inflammation évoluera vers une réponse immunitaire spécifique ou acquise. Plusieurs travaux suggèrent que la transition de la réponse immunitaire innée à une réponse immunitaire acquise débiterait déjà lors des pulpites réversibles. En effet, la carie étant un processus lent, l'inflammation pulpaire se déroule souvent sur un mode chronique avec des phases inflammatoires aiguës.

b- Dentinogénèse réactionnelle (13,82,83)

La principale fonction des odontoblastes au cours du développement est d'assurer la synthèse et la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire (ECM) de la prédentine. Ils participent ensuite à la biominéralisation de cette prédentine en dentine.

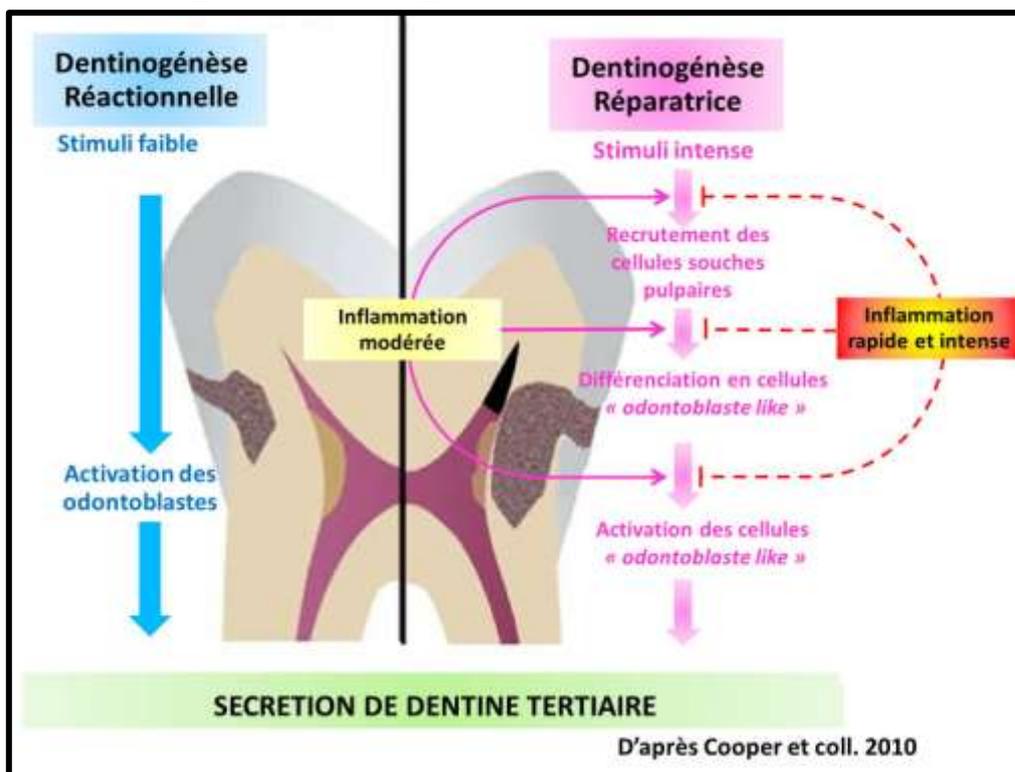
Les odontoblastes conservent la capacité de sécréter de la dentine tout au long de la vie et notamment de la dentine tertiaire en réponse à une atteinte dentinaire (ex : carieuse ou traumatique). Des facteurs tels que la nature de l'agression (vitesse, profondeur de la lésion dentinaire) vont déterminer le type de dentine tertiaire sécrétée (voir Figure 11 p. suivante).

Si l'agression est faible ou modérée et n'entraîne pas la dégénérescence des odontoblastes, l'activité de ces derniers sera stimulée. Les odontoblastes sécréteront alors de la dentine dite réactionnelle. Les mécanismes permettant la réactivation des odontoblastes sont encore mal élucidés. Plusieurs travaux suggèrent que les protéines de la famille du TGF β pourraient être impliquées dans cette activation (83).

Si l'agression est plus importante (ex: carie ou lésion dentaire profonde) elle peut conduire à la dégénérescence des odontoblastes. Les cellules de Höhl, situées dans la couche sous odontoblastique peuvent se différencier en odontoblastes et produire, là encore, de la dentine réactionnelle.

Dans le cas où l'agression est plus profonde et entraîne aussi la disparition des cellules de Höhl, différents facteurs de croissance produits lors de la réaction inflammatoire pulpaire (ex : TNF α), peuvent induire le recrutement de cellules souches progénitrices du centre de la pulpe au site de l'agression dentinaire et leur différenciation en cellules « odontoblaste-like ». Ces cellules, une fois activées vont sécréter de la dentine dite réparatrice. Là encore, les mécanismes et les médiateurs impliqués dans ce processus ne sont pas encore clairement établis.

Figure 11: Dentinogénèse tertiaire et inflammation



Nous avons vu dans le chapitre IV que le NO et ses dérivés étaient reconnus aujourd'hui pour jouer de multiples rôles dans l'inflammation. De rares études portent sur son éventuelle participation dans l'inflammation pulpaire. Nous verrons qu'elles permettent de suggérer qu'il y a une augmentation de NO lors de l'inflammation pulpaire et que ce dernier pourrait comme pour toute inflammation participer au développement des pulpites.

VI-3-B Production de NO lors de l'inflammation pulpaire

a- Expression des NOS dans les pulpites:

Quelques travaux rapportent l'expression de la NOSi dans l'inflammation pulpaire d'origine infectieuse.

L'expression de la NOSi dans des pulpes humaines fut pour la première fois évaluée en 2004 par Di Nardo Di Maio et coll. (19). L'étude était réalisée sur des pulpes humaines provenant de dent de sagesse extraites réparties, selon des critères diagnostic, en 3 groupes: 1) pulpes saines, 2) pulpites réversibles et 3) pulpites irréversibles.

L'analyse immunohistochimique (n=5 pour chaque groupe) révélait la présence de NOSi, localisée au niveau des leucocytes (PMN et macrophages essentiellement) dans les 2 groupes « pulpites ». Un marquage moins intense était aussi observé au niveau des odontoblastes. Aucun marquage NOSi+ n'était observé dans le groupe témoin (pulpe saine). L'intensité du

marquage était augmentée dans le groupe « pulpites irréversibles » par rapport au groupe « pulpites réversibles ».

La présence de NOSi dans les pulpes inflammatoires ou au contraire l'absence de NOSi dans le groupe témoin était confirmée par la mesure de l'expression d'ARNm par RT-PCR et de la protéine par Western Blot (n=5 pour chaque groupe).

La mesure de l'expression de NOSe était aussi réalisée dans cette étude. L'analyse immunohistochimique révélait un marquage NOSe+ au niveau des cellules endothéliales, des odontoblastes et des fibroblastes dans les 3 groupes étudiés. Le niveau d'expression de cette enzyme différait cependant dans les 3 groupes.

En effet, les auteurs rapportent que l'expression de la NOSe était augmentée dans le groupe « pulpites réversibles » par rapport au groupe témoin. Au contraire, elle était diminuée dans le groupe « pulpites irréversibles » par rapport au témoin. L'ensemble de ces données suggère que l'inflammation pulpaire irréversible entraînerait une augmentation de la production de NO par les NOSi et au contraire, une diminution de la production de NO par les NOSe, ce qui pourrait altérer ses fonctions régulatrices. L'augmentation d'expression de la NOSe lors d'inflammations réversibles, suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans les processus de cicatrisation pulpaire.

Dans une étude immunohistochimique plus récente, Korkmaz et coll. (51) montrent aussi une augmentation de l'expression de NOSi dans des pulpes inflammatoires (pulpites irréversibles, n=5) par rapport à des pulpes saines (n=5). Le marquage NOSi+ était augmenté au niveau des cellules du conjonctif pulpaire ainsi que dans les odontoblastes. De plus, ils montrent, toujours par immunohistochimie, la formation de 3-nitrotyrosine dans le conjonctif et les odontoblastes des pulpes inflammatoires alors qu'aucune 3-nitrotyrosine n'était détectée dans les pulpes saines. Ces données suggèrent que le NO produit par les NOSi lors de l'inflammation pulpaire est à l'origine de la formation de peroxynitrite et que ce dernier entraîne la nitration de protéines sur son lieu de production.

Les auteurs ont aussi cherché à évaluer l'expression des sous unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$ de la guanylate cyclase. Rappelons que cette enzyme est formée de 2 hétérodimères constitués chacun d'une sous unité α et d'une sous unité β . Rappelons aussi que c'est au travers de son activation de la guanylate cyclase que le NO intervient dans la régulation nombreuses fonctions physiologiques.

De manière intéressante, cette étude montre que l'expression des 3 sous unités de la guanylate cyclase était diminuée dans les odontoblastes des pulpes inflammatoires comparée aux pulpes saines.

Ces données renforcent l'idée selon laquelle les fonctions régulatrices du NO sont altérées lors de l'inflammation pulpaire.

VI-3-C Effets des inhibiteurs de NO sur l'inflammation pulpaire

Deux études se sont intéressées aux effets de l'inhibition de la production de NO dans l'inflammation pulpaire.

Ces deux études, menées par la même équipe, étaient réalisées dans un modèle de pulpite induite par exposition pulpaire au LPS chez le rat.

La première étude (42) évaluait les effets, sur l'inflammation pulpaire induite par le LPS, de l'administration intraveineuse de 2 inhibiteurs des NOS, un inhibiteur très spécifique de la NOSi, le 1400W et un inhibiteur des NOS non spécifique d'une isoforme particulière, le L-NAME. Plus précisément, les auteurs ont caractérisé, par analyse immunohistochimique, les types cellulaires présents dans l'infiltrat inflammatoire après différent temps d'exposition des pulpes au LPS.

Une partie des résultats de cette étude sont représentés dans les figures 12 et 13 ci-dessous.

Figure 12: Cinétique d'infiltration des granulocytes (PMN) dans la pulpe après exposition au LPS (42)

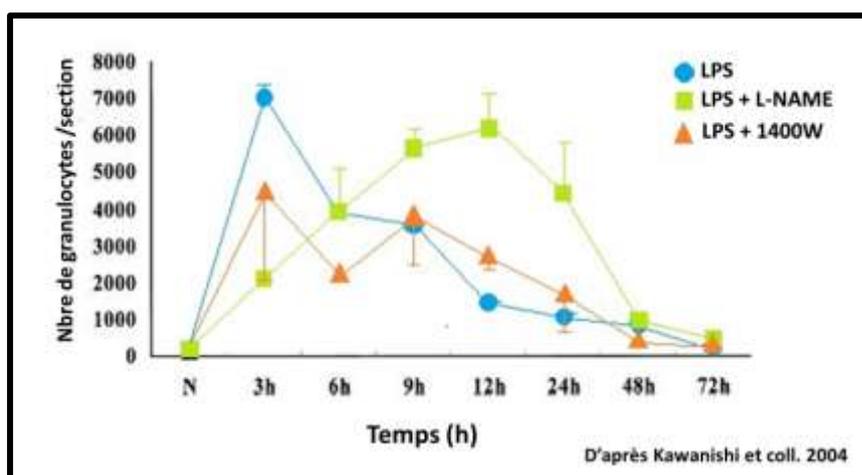
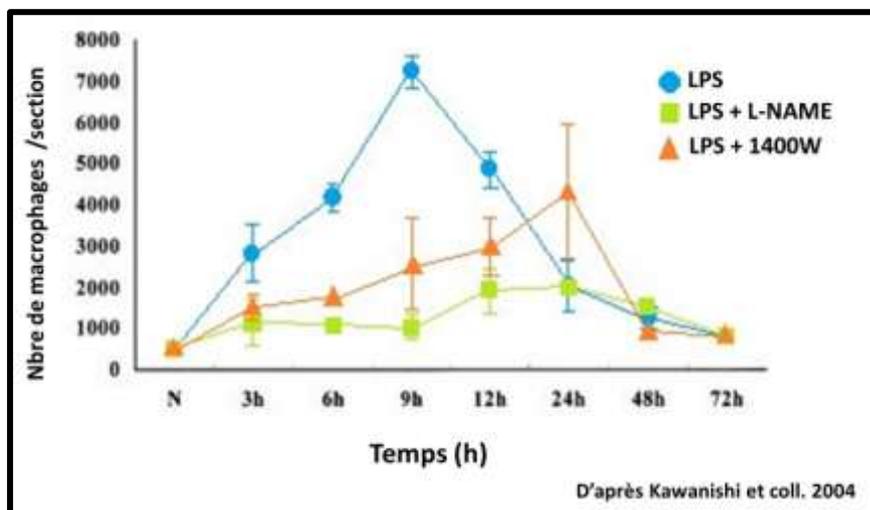


Figure 13: Cinétique d'infiltration des macrophages dans la pulpe après exposition au LPS (42)



Les résultats montrent que le LPS entraînait rapidement une augmentation importante mais transitoire du nombre de PMN dans la portion coronaire des pulpes (Figure 12). Le maximum de PMN étaient présents à 3h et leur nombre diminuait ensuite.

L'administration intraveineuse de L-NAME, 30 min avant l'application de LPS, retardait mais prolongeait la période d'infiltration des PMN, ces derniers étant toujours présents en grand nombre 12h après l'application du LPS. Au contraire, l'injection de 1400W, ne modifiait pas la cinétique d'infiltration des PMN mais le nombre de PMN infiltrés dans la pulpe à 3h était diminué par rapport aux pulpes infectées par le LPS seul.

L'application de LPS entraînait aussi une augmentation importante et transitoire du nombre de macrophages dans la pulpe (Figure 13). La cinétique d'infiltration était décalée comparée à celle des PMN, le nombre maximum de macrophages étant observé à 9h.

L'administration du L-NAME, ainsi que l'administration du 1400W diminuait considérablement l'infiltration des macrophages par rapport au LPS seul. De plus, dans les deux cas, la cinétique d'infiltration était retardée avec un nombre maximum de macrophages présents à 24h.

Ces résultats suggèrent que le NO jouerait un rôle dans l'infiltration des cellules inflammatoires et dans la progression de l'inflammation. En outre, ces travaux montrent que l'inhibition de la NOSi seule, permet de diminuer l'intensité et la progression de l'inflammation. L'absence de l'utilisation d'inhibiteur spécifique des NOSc dans cette étude ne permet pas de déterminer leurs rôles dans l'inflammation.

De nouveau, l'administration des inhibiteurs de NOS est réalisée avant d'induire l'inflammation et permet donc de déterminer le rôle du NO dans l'initiation du processus inflammatoire. L'administration de ces mêmes donneurs à différent temps du processus inflammatoire permettrait d'étudier si le NO influence aussi d'autres étapes de l'inflammation. En outre, il serait aussi intéressant de connaître les effets de l'application locale de ces inhibiteurs sur l'évolution de l'inflammation.

Dans le même modèle, Kawashima et coll. (43) ont mesuré par RT-PCR semiquantitative, à différent temps après l'application de LPS sur les pulpes (3, 6, 9, 12, 24h), l'expression de la NOSi, de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α) et anti-inflammatoire (IL-10) et de la COX2.

Une analyse immunohistochimique de l'expression de NOSi était aussi réalisée à ces mêmes temps et montrent que des cellules inflammatoires NOSi+ étaient présentes autour des vaisseaux sanguins pulpaire dès 3h puis infiltraient l'ensemble de la pulpe à 6h. Un co-marquage avec des anticorps spécifiques des différents types cellulaires permettait d'établir

que les cellules NOSi+ à 3h correspondaient, pour la plupart, à des PMN. A 6h, la majorité des cellules exprimant la NOSi étaient des macrophages.

La cinétique d'expression des cytokines et de COX2 après l'induction de l'inflammation, montrent que l'expression des ARN de l'ensemble des cytokines pro-inflammatoires et de COX2 était induite dès 3h après application du LPS. Cette expression atteignait son maximum à 6h et diminuait ensuite. L'induction par le LPS de l'expression des ARN codant pour l'IL-10 n'était observé qu'à partir de 6h et diminuait ensuite. A 24h après l'application de LPS, la quantité d'ARN codant pour l'IL-1 β était encore élevée.

Les auteurs ont ensuite évalué les effets de l'injection systémique du L-NAME, 15 min avant l'induction de l'inflammation pulpaire, sur l'ensemble des ARN à 6h.

Les résultats montrent que l'inhibiteur de NOS entraînait une diminution importante de l'expression des ARN codant pour les cytokines inflammatoires ; IL-1 α , IL-1 β et TNF α et pour la COX2. De manière intéressante, le L-NAME n'affectait pas l'expression d'IL-6 et d'IL-10.

Ces données suggèrent que le NO participerait à l'inflammation en permettant la production initiale de médiateurs inflammatoires.

Ces travaux ne permettent cependant pas de définir clairement les mécanismes par lesquels le NO agit sur l'expression de ces médiateurs.

En effet, la diminution de l'expression des cytokines et de la COX-2 entraînée par le L-NAME peut en parti être due à une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires. Bien que de nombreux travaux montrent que le NO est capable d'induire aussi l'expression de certaines protéines, rien dans cette étude ne permet de conclure que le NO agisse ici, directement sur l'expression des médiateurs inflammatoires étudiés. Là encore, une administration des inhibiteurs après l'initiation de l'inflammation serait intéressante et aurait pu partiellement répondre à cette question.

Ces deux études montrent néanmoins clairement que l'inhibition de la synthèse de NO avant l'initiation de l'inflammation, dans ce modèle, diminue considérablement l'intensité et la progression de l'inflammation pulpaire. Ces études se limitent aux phases précoces d'une inflammation aiguë. Le modèle d'étude utilisé ici rend compte du processus inflammatoire mis en place juste après la mise en contact de bactérie avec la pulpe de manière brutale comme c'est le cas lors de fracture dentino-pulpaire ou lors d'effraction camérale d'origine iatrogène (lors de soins dentaire par exemple). D'autres études analysant des phases inflammatoires plus tardives ou réalisées sur des modèles d'inflammation chroniques seraient nécessaires pour évaluer la participation du NO dans les pulpites d'origine carieuse.

VI-3-D NO, odontoblastes et dentinogénèse réactionnelle

Nous avons vu que les odontoblastes sont capables de produire du NO puisqu'ils expriment les deux NOS constitutives (19,22,50) dans des conditions physiologiques ainsi que la NOSi lors de l'inflammation (19,51). Pourtant peu d'études se sont intéressées au rôle du NO dans les odontoblastes.

Dans une étude de 2007, Mei et coll. ont émis l'hypothèse que le NO pourrait réguler la différenciation et l'activation des odontoblastes lors des processus de réparation dentinaire (63).

Pour vérifier cette hypothèse, ils ont évalué dans la pulpe de rat, les effets de la préparation d'une cavité dentinaire sur l'expression au cours du temps (1,3 et 7 jours), de la NOSe, de la NOSi et de 2 marqueurs de la différenciation des odontoblastes, la phosphatase alcaline (ALP) et l'ostéocalcine.

L'analyse par RT-PCR des ARN codant pour les différents gènes étudiés montrent que la préparation d'une cavité de 0,4mm de profondeur sur la face mésiale de la 1ère molaire maxillaire chez le rat entraînait une diminution significative d'ARNm codant pour la NOSe après 3 jours. L'ARNm codant pour la NOSi était significativement augmenté par rapport au témoin 1 et 3 jours après la réalisation de la cavité, puis une diminution significative par rapport au témoin était observée à 7 jours. L'expression d'un marqueur précoce de la différenciation des odontoblastes, l'ALP, était faiblement mais significativement augmenté après 1 jour puis diminué significativement après 3 jours. L'expression de l'ARNm codant pour l'ostéocalcine, marqueur plus tardif de la différenciation des odontoblastes, était augmenté significativement 1 et 3 jours après la préparation de la cavité, puis diminuait pour retrouver le niveau d'expression du témoin à 7 jours.

Une analyse immunohistologique permettait de localiser l'expression de la NOSe, de la NOSi et de nitrotyrosines, et l'activité ALP dans les tissus pulpaire au cours du temps. Au contraire de la NOSi, la NOSe était détectée dans la pulpe des tissus témoins au niveau des odontoblastes et de cellules situées dans la zone centrale de pulpe. Une activité ALP était observée dans la zone sous odontoblastique et au niveau des odontoblastes (activité plus faible).

Un jour après la préparation, la zone située sous la cavité était infiltrée au niveau de l'interface dentine-pulpe, par des PMN exprimant la NOSi. Les odontoblastes à ce niveau avait disparu. Un marquage NOSi+ était aussi observé dans les cellules adjacentes aux neutrophiles et dans des cellules situées dans la zone plus interne de la pulpe. Un faible

marquage NOSe+ était aussi détecté dans la pulpe. A ce stade, une activité ALP intense était présente dans les cellules proches des PMN.

A 3 jours, les auteurs observaient dans la région située sous la cavité, l'accumulation de cellules cylindriques qu'ils supposent être des odontoblastes. Un marquage NOSi+ intense était détecté dans ces cellules ainsi que dans la région plus interne de la pulpe. Là encore, seul un faible marquage NOSe+ était présent dans la pulpe.

L'activité ALP était toujours intense au niveau des cellules de la pulpe situées sous la cavité, notamment au niveau des cellules cylindriques.

Sept jours après la préparation, la formation de dentine tertiaire était observée en regard de la cavité. Comme dans les tissus témoins, un marquage NOSe+ était présent au niveau des odontoblastes alors qu'aucun marquage NOSi+ ne pouvait être détecté à ce stade. De plus, une activité ALP était observée dans la zone sous odontoblastique et au niveau des odontoblastes.

Il est à noter que la formation de nitrotyrosine était co-localisée chaque fois avec l'expression de iNOS.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le NO pourrait participer aux processus de réparation de la dentine lors d'atteinte dentinaire. De manière intéressante, cette étude montre que l'induction de l'expression de la NOSi et la formation de nitrotyrosine sont synchronisées avec l'augmentation des marqueurs de différenciation odontoblastiques. On peut émettre l'hypothèse que le NO produit par la NOSi pourrait, via des nitrations de protéines spécifiques, induire la différenciation en odontoblastes, des cellules de Höhl ou des cellules mésenchymateuses indifférenciées de la pulpe. Dans le cas où d'autres études vérifierait cette hypothèse, le NO et les NOS pourraient s'avérer être des cibles potentielles pour induire la formation de dentine tertiaire lors de traitements conservateurs.

VI-3-E Intérêt de l'étude du NO dans la pulpe.

L'ensemble de ces travaux démontrent que le NO est exprimé dans la pulpe saine et inflammatoire.

La présence des NOS constitutives et du système GMPc-GCs dans la pulpe saine laisse supposer qu'elles participent aux fonctions physiologiques de la pulpe. De rares études suggèrent que le NO pourrait intervenir dans la régulation de la circulation sanguine pulpaire mais les mécanismes impliqués restent à déterminer.

L'expression de NOSn dans les fibres nerveuses pulpaire permet d'émettre l'hypothèse d'un rôle du NO dans la neurotransmission pulpaire physiologique. A notre connaissance, ce rôle n'a pas été véritablement exploré.

Une meilleure connaissance des rôles et des mécanismes faisant intervenir le NO dans la physiologie pulpaire pourrait permettre d'améliorer la pratique odontologique notamment lors de soins conservateurs.

En effet, aujourd'hui, la prise en charge clinique des lésions carieuses s'appuie sur les notions de pulpite réversible/irréversible et propose 2 grands types de traitements : Les traitements conservateurs dans le cas de pulpites réversibles et les traitements endodontiques lors de pulpites diagnostiquées comme irréversibles.

Pourtant, d'un point de vue histologique et clinique, la démarcation entre pulpite réversible et pulpite irréversible demeurent relativement floue. De plus, les mécanismes et les médiateurs impliqués dans l'évolution d'une pulpite réversible vers une pulpite irréversible restent à déterminer. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans le cadre de la prise en charge des lésions carieuses.

Là encore, peu d'études se sont intéressées aux rôles du NO dans l'inflammation pulpaire. Pourtant, les quelques données à notre disposition semblent indiquer qu'il participe activement au processus inflammatoire pulpaire et qu'il pourrait s'avérer important dans la mise en place des mécanismes de réparation dentinaire.

De nombreuses questions demeurent cependant :

Quel est l'impact des NOSc sur le développement de l'inflammation? L'altération du système NOSc-GCs-GMPc est-il déterminant dans l'évolution de l'inflammation vers un processus irréversible ? Est-il possible de contrôler l'inflammation en modulant la production de NO à différents stades inflammatoires? Quelle est le rôle du NO produit par les odontoblastes dans la pulpe saine ? La réponse à ces questions permettrait, peut-être, de mieux contrôler cliniquement, la vitalité pulpaire et pourrait offrir de nouvelles possibilités thérapeutiques en odontologie conservatrice.

La découverte des cellules dites « souches » dans la pulpe dentaire (26) a permis depuis 2000 de relancer sérieusement l'intérêt de la recherche en odontologie au-delà des limites de la dentisterie. En effet, ces cellules souches de la pulpe dentaires possèdent en plus de leur capacité de renouvellement, la capacité d'acquérir d'autres voies de différenciation que celle de la différenciation en odontoblaste (77). La culture en présence de facteurs de croissances et de différenciations spécifiques a permis de montrer qu'elles pouvaient se différencier en ostéoblastes, en cellules neuronales, en cellules adipocytaires ou encore en chondrocytes. Ces découvertes associées aux développements de techniques d'ingénieries tissulaires permettent

d'envisager des applications cliniques intéressant non seulement le domaine de l'odontologie (cicatrisation pulpodentinaire, régénération pulpaire, régénération complète de l'organe dentaire) mais aussi d'autres domaines de la médecine (régénération de tissu osseux, de cartilage, de tissu nerveux ...). De nombreux travaux ont montré le rôle essentiel du NO au cours du développement et dans les processus de différenciation (67,69,79). Dans un tel contexte, l'étude du rôle du NO dans la pulpe, et plus spécifiquement dans la différenciation des cellules souches d'origine dentaire pourrait s'avérer particulièrement intéressante.

VII. Conclusion

Désignée molécule de l'année par la revue internationale "Science" en 1992 (53), le NO suscite pourtant toujours autant d'intérêt en 2012. En effet, on estime aujourd'hui à environ 3000 par an le nombre d'articles scientifiques concernant la recherche sur le NO.

Dans un tel contexte, il n'est pas étonnant que le NO suscite aussi un intérêt dans le domaine de l'odontologie.

Les études que nous avons citées ont permis de clairement montrer qu'il était constamment produit dans l'organe dentaire (pulpe et parodonte). De ces travaux ressort aussi sa participation dans les pathologies inflammatoires pulpaire et parodontales. Pourtant, son rôle précis dans la physiologie pulpaire, ou dans l'évolution des processus inflammatoires pulpaire et parodontaux n'est pas clairement établi.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes limités aux études s'intéressant au NO dans la pulpe et dans les maladies parodontales et nous n'avons abordé que très peu la participation du stress oxydatif dans les situations pathologiques en odontologie. Ce sujet suscite, cependant, de nombreuses recherches et certains dérivés du NO sont directement impliqués dans l'établissement d'un déséquilibre redox (6,12).

De l'implication du NO en physiologie et en pathologie intéressant le domaine de l'odontologie, de la parodontologie et de la médecine buccale, naît l'intérêt thérapeutique qu'il pourrait y avoir à moduler l'expression et/ou l'activité de cette molécule par des agents pharmacologiques. Une meilleure compréhension des mécanismes faisant intervenir le NO et ses dérivés dans les processus physiologiques et physiopathologiques de la sphère buccale pourrait permettre de définir de nouvelles cibles pharmacologiques et ainsi d'améliorer la prise en charges des patients en odontologie.

Références bibliographiques

1. ALAYAN J, IVANOVSKI S, GEMMELL E et coll.

Deficiency of iNOS contributes to Porphyromonas gingivalis-induced tissue damage.
Oral Microbiol Immunol 2006;**21**(6):360-365.

2. ALDERTON WK, COOPER CE et KNOWLES RG.

Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.
Biochem J 2001;**357**(3):593-615.

3. ARTESE L, PIATTELLI A, DE GOUVEIA CARDOSO LA et coll.

Immunoexpression of angiogenesis, nitric oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis.
J Periodontol 2010;**81**(5):718-726.

4. AURER A, ALEKSIC J, IVIC-KARDUM M et coll.

Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis.
J Clin Periodontol 2001;**28**(6):565-568.

5. BATISTA AC, SILVA TA, CHUN JH et coll.

Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease.
Oral Dis 2002;**8**(5):254-260.

6. BATTINO M, BULLON P, WILSON M et coll.

Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species.
Crit Rev Oral Biol Med 1999;**10**(4):458-476.

7. BECKMAN JS et KOPPENOL WH.

Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.
Am J Physiol 1996;**271**(5 Pt 1):C1424-C1437.

8. BJØRNDAL L et MJÖR IA.

Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries-characteristics of lesions and pulpal reactions.
Quintessence Int 2001;**32**(9):717-736.

9. BLIX IJ et HELGELAND K.

LPS from Actinobacillus actinomycetemcomitans and production of nitric oxide in murine macrophages J774. Eur J Oral Sci 1998;**106**(1):576-581.

10. BROWN GC.

Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase.
Biochim Biophys Acta 2001;**1504**(1):46-57.

11. CARPENTER AW et SCHOENFISCH MH.

Nitric oxide release: part II. Therapeutic applications.
Chem Soc Rev 2012;**41**(10):3742-3752.

12. CHAPPLE IL et MATTHEWS JB.

The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction.
Periodontol 2000 2007;**43**:160-232.

13. COOPER PR, TAKAHASHI Y, GRAHAM LW et coll.

Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex.
J Dent 2010;**38**(9):687-697.

14. CULLINAN MP, FORD PJ et SEYMOUR GJ.

Periodontal disease and systemic health: current status.
Aust Dent J 2009;**54**(Suppl 1):S62-S69.

15. DAGHIGH F, BORGHAEI RC, THORNTON RD et coll.

Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines.
J Periodontol 2002 ;**73**(4):392-400.

16. DE CATERINA R, LIBBY P, PENG HB et coll.

Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines.
J Clin Invest 1995;**96**(1):60-68.

17. DE MENEZES AM, DE SOUZA GF, GOMES AS et coll.

S-nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats.
J Periodontol 2012;**83**(4):514-521.

18. DENNINGER JW et MARLETTA MA.

Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway.
Biochim Biophys Acta 1999;**1411**(2/3):334-350.

19. DI NARDO DI MAIO F, LOHINAI Z, D'ARCANGELO C et coll.

Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp.
J Dent Res 2004;**83**(4):312-316.

20. DI PAOLA R, MARZOCCO S, MAZZON E et coll.

Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats.
J Dent Res 2004;**83**(4):343-348.

21. DUONG-QUY S, RIVIERE S, BEI Y et coll.

Pulmonary hypertension: From molecular pathophysiology to haemodynamic abnormalities.
Rev Mal Respir 2012;**29**(8):956-970.

22. FELACO M, DI MAIO FD, DE FAZIO P et coll.

Localization of the e-NOS enzyme in endothelial cells and odontoblasts of healthy human dental pulp.
Life Sci 2000;**68**(3):297-306.

23. FRIEBE A et KOESLING D

The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models.
Nitric Oxide 2009;**21**(3/4):149-156.

24. FUKADA SY, SILVA TA, SACONATO IF et coll.

iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss.
J Dent Res 2008;**87**(12):1155-1159.

25. GARLET GP.

Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints.
J Dent Res 2010;**89**(12):1349-1363.

26. GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J et coll.

Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A 2000;**97**(25):13625-13630.

- 27. GÜLLÜ C, OZMERIC N, TOKMAN B et coll.**
Effectiveness of scaling and root planing versus modified Widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis.
J Periodont Res 2005;**40**(2):168-175.
- 28. GUZIK TJ, KORBUT R et ADAMEK-GUZIK T.**
Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.
J Physiol Pharmacol 2003;**54**(4):469-487.
- 29. GYURKO R, BOUSTANY G, HUANG PL et coll.**
Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of *Porphyromonas gingivalis*.
Infect Immun 2003;**71**(9):4917-4924.
- 30. GYURKO R, SHOJI H, BATTAGLINO RA et coll.**
Inducible nitric oxide synthase mediates bone development and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss.
Bone 2005;**36**(3):472-479.
- 31. HAHN CL et LIEWEHR FR.**
Innate immune responses of the dental pulp to caries.
J Endod 2007;**33**(6):643-651.
- 32. HAHN CL et LIEWEHR FR.**
Update on the adaptive immune responses of the dental pulp.
J Endod 2007;**33**(7):773-781.
- 33. HERRERA BS, MARTINS-PORTO R, MAIA-DANTAS A et coll.**
iNOS-derived nitric oxide stimulates osteoclast activity and alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats.
J Periodontol 2011;**82**(11):1608-1615
- 34. HEYERAAS KJ, SVEEN OB et MJÖR IA.**
Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 3: Pulpal inflammation and its sequelae.
Quintessence Int 2001;**32**(8):611-625.
- 35. HIGASHI Y, GOTO C, HIDAKA T et coll.**
Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease.
Atherosclerosis 2009;**206**(2):604-610.
- 36. HIGASHI Y, GOTO C, JITSUIKI D et coll.**
Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients.
Hypertension 2008;**51**(2):446-453.
- 37. HILL BG, DRANKA BP, BAILEY SM et coll.**
What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology.
J Biol Chem 2010;**285**(26):19699-19704.
- 38. HOGG N.**
Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols.
Free Radic Biol Med 2000;**28**(10):1478-1486
- 39. HOGG N et KALYANARAMAN B.**
Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation.
Free Radic Res 1998;**28**(6):593-600.

40. IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS et coll.

Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;**84**(24):9265–9269.

41. JIANG R, WANG S, TAKAHASHI K et coll.

Generation of a conditional allele for the mouse endothelial nitric oxide synthase gene.
Genesis 2012;**50**(9):685-692.

42. KAWANISHI HN, KAWASHIMA N, SUZUKI N, et coll.

Effects of an inducible nitric oxide synthase inhibitor on experimentally induced rat pulpitis.
Eur J Oral Sci 2004;**112**(4):332-337.

43. KAWASHIMA N, NAKANO-KAWANISHI H , SUZUKI N et coll.

Effect of NOS inhibitor on cytokine and COX2 expression in rat pulpitis.
J Dent Res 2005;**84**(8):762-767.

44. KENDALL HK, HAASE HR, LI H et coll.

Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts.
J Periodontal Res 2000;**35**(4):194-200.

45. KEREZOU DIS NP, OLGART L et FRIED K.

Localization of NADPH-diaphorase activity in the dental pulp, periodontium and alveolar bone of the rat.
Histochemistry 1993;**100**(4):319-322.

46. KIM J et AMAR S.

Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship.
Odontology 2006;**94**(1):10-21.

47. KIM SF, HURI DA et SNYDER SH.

Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2.
Science 2005;**310**(5756):1966-1970.

48. KISPÉLYI B, LOHINAI Z, IVÁNYI I et coll.

The effect of local nitric oxide synthase inhibition on the diameter of pulpal arteriole in dental bond material-induced vasodilation in rat.
Life Sci 2005;**77**(12):1367-1374.

49. KOLIOS G, VALATAS V et WARD SG.

Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle.
Immunology 2004;**113**(4):427-437.

50. KORKMAZ Y, BAUMANN MA, STEINRITZ D et coll.

NO-cGMP signaling molecules in cells of the rat molar dentin-pulp complex.
J Dent Res 2005;**84**(7):618-623.

51. KORKMAZ Y, LANG H, BEIKLER T et coll.

Irreversible inflammation is associated with decreased levels of the alpha1-, beta1-, and alpha2-subunits of sGC in human odontoblasts.
J Dent Res 2011;**90**(4):517-522.

52. KORNMAN KS, PAGE RC et TONETTI MS.

The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players.
Periodontol 2000 1997;**14**:33-53.

53. KOSHLAND DE JR.

The molecule of the year.
Science 1992;**258**(5090):1861.

54. LANCASTER JR JR.

Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide.
Proc Natl Acad Sci U S A 1994;**91**(17) 8137-8141.

55. LAPPIN DF, KJELDSEN M, SANDER L et coll.

Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis.
J Periodontal Res 2000;**35**(6):369-373.

56. LEE C, MIURA K, LIU X et coll.

Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite.
J Biol Chem 2000;**275**(50):38965-38972.

57. LEITÃO RF, RIBEIRO RA, CHAVES HV et coll.

Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats.
J Periodontol 2005;**76**(6):956-963.

58. LEITÃO RF, ROCHA FA, CHAVES HV et coll.

Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats.
J Periodontol 2004;**75**(9):1227-1232.

59. LOHINAI Z, BALLA I, MARCZIS J et coll.

Evidence for the role of nitric oxide in the circulation of the dental pulp.
J Dent Res 1995;**74**(8):1501-1506.

60. LOHINAI Z, BENEDEK P, FEHER E et coll.

Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat.
Br J Pharmacol 1998;**123**(3):353-360.

61. LOHINAI Z, STACHLEWITZ R, VIRAG L et coll.

Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue.
J Dent Res 2001;**80**(2):470-475.

62. LOHINAI Z, SZÉKELY AD, BENEDEK P et coll.

Nitric oxide synthase containing nerves in the cat and dog dental pulp and gingiva.
Neurosci Lett 1997;**227**(2):91-94.

63. MEI YF, YAMAZA T, ATSUTA I et coll.

Sequential expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, and nitrotyrosine in odontoblasts and pulp cells during dentin repair after tooth preparation in rat molars.
Cell Tissue Res 2007;**328**(1):117-127.

64. MENAKA KB, RAMESH A, THOMAS B et coll.

Estimation of nitric oxide as an inflammatory marker in periodontitis.
J Indian Soc Periodontol 2009;**13**(2):75-78.

65. MILLER MR et MEGSON IL.

Recent developments in nitric oxide donor drugs.
Br J Pharmacol 2007;**151**(3):305-321.

66. MJÖR IA et ODONT D.

Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 2: initial reactions to preparation of teeth for restorative procedures.
Quintessence Int 2001;**32**(7):537-551.

- 67. MUJOO K, KRUMENACKER JS et MURAD F.**
Nitric oxide-cyclic GMP signaling in stem cell differentiation.
Free Radic Biol Med 2011;**51**(12):2150-2157.
- 68. NATHAN C.**
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.
FASEB J 1992;**6**(12):3051-3064
- 69. NOTT A et RICCIO A.**
Nitric oxide-mediated epigenetic mechanisms in developing neurons.
Cell Cycle 2009;**8**(5):725-730.
- 70. OZER L, ELGUN S, OZDEMIR B et coll.**
Arginine-nitric oxide-polyamine metabolism in periodontal disease.
J Periodontol 2011;**82**(2):320-328.
- 71. PARWANI S, CHITNIS P et PARWANI R.**
Salivary nitric oxide levels in inflammatory periodontal disease - A case-control and interventional study.
Int J Dent Hyg 2011;**10**(1):67-73.
- 72. PATEL RP, MCANDREW J, SELLAH H et coll.**
Biological aspects of reactive nitrogen species.
Biochim Biophys Acta 1999;**1411**(2/3):385-400.
- 73. PAUL-CLARK MJ, GILROY DW, WILLIS D et coll.**
Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration.
J Immunol 2001;**166**(2):1169-1177.
- 74. PIETTE E et GOLDBERG M.**
La dent normale et pathologique.
Bruxelles: De Boeck Université, 2001.
- 75. POON BY, RAHARJO E, PATEL KD et coll.**
Complexity of inducible nitric oxide synthase: cellular source determines benefit versus toxicity.
Circulation 2003;**108**(9):1107-1112.
- 76. REHER VG, ZENOBIO EG, COSTA FO et coll.**
Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis.
J Oral Sci 2007;**49**(4):271-276.
- 77. RENARD E, LOPEZ-CAZAUX S, GUICHEUX J et coll.**
Stem cells of dental pulp.
C R Biol 2007;**330**(9):635-643.
- 78. RUBBO H, RADI R, ANSELMINI D et coll.**
Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate.
J Biol Chem 2000;**275**(15):10812-10818.
- 79. SAURA M, TARIN C et ZARAGOZA C.**
Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development.
Sci World J 2010;**10**:624-632.

- 80. SHAPIRA L, CHAMPAGNE C, VAN DYKE TE et coll.**
Strain-dependent activation of monocytes and inflammatory macrophages by lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*.
Infect Immun 1998;**66**(6):2736-2742.
- 81. SINGH D, RICHARDS D, KNOWLES RG et coll.**
Selective inducible nitric oxide synthase inhibition has no effect on allergen challenge in asthma.
Am J Respir Crit Care Med 2007;**176**(10):988-993.
- 82. SIMON SR, BERDAL A, COOPER PR et coll.**
Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic.
Adv Dent Res 2011;**23**(3):340-345
- 83. SIMON SR, COOPER P, BERDAL A et coll.**
Pulp biology: understanding in daily practice.
Rev Odont Stomat 2008;**37**(3):209-235
- 84. STAMLER JS, LAMAS S et FANG FC.**
Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism.
Cell 2001;**106**(6):675-683.
- 85. WIMALAWANSA SJ.**
Nitric oxide and bone.
Ann N Y Acad Sci 2010;**1192**:391-403.
- 86. WINK DA et MITCHELL JB.**
Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide.
Free Radic Biol Med 1998;**25**(4/5):434-456
- 87. XU L, HAN C, LIM K et coll.**
Activation of cytosolic phospholipase A2alpha through nitric oxide-induced S-nitrosylation. Involvement of inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase-2.
J Biol Chem 2008;**283**(6):3077-3087.

Table des Figures

Figure 1: Les NO Synthases	18
Figure 2: Effets directs et indirects du NO	19
Figure 3: Les 2 isoformes actives de la guanylate cyclase soluble	24
Figure 4: NO et vasodilatation: Mécanismes d'actions.....	26
Figure 5: Effets du NO et de ces dérivés pouvant jouer un rôle dans l'inflammation	27
Figure 6: Rôle des Cyclooxygénases: Synthèse des prostanoïdes.....	29
Figure 7: Principaux acteurs de l'inflammation parodontale	31
Figure 8: Inflammation parodontale et dommages tissulaires.....	32
Figure 9: Tableau récapitulatif des résultats de l'étude de De Menezes et coll.	48
Figure 10: Principales cellules et cytokines impliquées dans la réponse immunitaire de la pulpe	55
Figure 11: Dentinogénèse tertiaire et inflammation	57
Figure 12: Cinétique d'infiltration des granulocytes (PMN) dans la pulpe après exposition au LPS...	59
Figure 13: Cinétique d'infiltration des macrophages dans la pulpe après exposition au LPS	59

Lexique

Apoptose: Processus de mort cellulaire programmée par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. L'apoptose fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme en permettant par exemple, d'éliminer les cellules devenues inutiles (ex: cellules entre les doigts au cours du développement embryonnaire), incompetentes ou qui présentent des dommages irréparables.

Contrairement à la nécrose, c'est une mort « propre » puisque dans un premier temps, les membranes plasmiques ne sont pas détruites, et le contenu cellulaire n'est pas « déversé » dans l'organisme. La cellule émet des signaux qui permettront sa phagocytose par des globules blancs, notamment des macrophages.

Cellule NK : (« Natural Killer » en anglais). Les cellules NK sont des lymphocytes, aussi appelées cellules tueuses naturelles ou lymphocytes nuls. Elles ne correspondent cependant ni à un lymphocyte B ni à un lymphocyte T. La spécificité de ces cellules est qu'elles sont capables de lyser des cellules malades ou étrangères à l'organisme de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable.

Facteurs de transcription : Un facteur de transcription est une protéine nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la transcription de l'ARN en protéine. Ce sont des activateurs ou des répresseurs du complexe transcriptionnel constitué autour de l'ARN polymérase qui agissent en se fixant sur les séquences régulatrices en amont des gènes à transcrire. La modification de ces facteurs de transcription permettant l'activation ou l'inhibition de sa fonction aura donc pour conséquence une modification de l'expression des protéines sous le contrôle de ce facteur de transcription.

Griess (méthode de) : C'est la technique la plus simple pour mesurer le NO[•]. Plus exactement, elle mesure la formation de nitrite (NO₂⁻) qui est le principal produit formé par l'oxydation de NO[•] en solution aqueuse. Le NO₂⁻ réagit avec le sulphanalamide dans une solution acide de N-(1-naphtyl) éthylènediamine et génère un composé coloré dont l'absorbance est mesurable à 548nm. In vivo le NO₂⁻ peut être décomposé en NO₃⁻, plus stable, qui peut être mesuré en utilisant de la nitrate réductase lors du test.

Myéloperoxidase : La myéloperoxidase (MPO) est une enzyme présente en grande quantité dans les PMN et qui est sécrétée pendant leur activation. Elle catalyse la formation d'acide hypochloreux (HOCl), un oxydant fort et participe ainsi à l'élimination des agents agresseurs.

Peroxydation lipidique : Processus initié par des radicaux libres et qui aboutit à la détérioration oxydative des acides gras polyinsaturés et à la génération de radicaux peroxydes hautement réactifs à l'origine de nombreux dommages cellulaires.

Radical ou composé radicalaire : Un radical (souvent appelé radical libre) est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. Il se note par un point. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules, la plupart du temps, une grande instabilité ce qui signifie qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés.

RT-PCR : « Reverse transcriptase polymerase chain reaction », en anglais. C'est une technique de biologie moléculaire d'amplification permettant de répliquer une séquence d'ARN recherchée et présente en petit nombre en une quantité suffisante pour permettre sa détection. L'amplification concomitante d'un ARN standard interne dont l'expression est supposée être constante permet d'obtenir une quantité relative de l'ARN d'intérêt : On parle alors de RT-PCR semi-quantitative.

Western Blot : C'est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. Un homogénat provenant de tissu ou cellules est traité pour permettre la dénaturation des protéines et l'obtention d'un lysat protéique. Les protéines de ce lysat sont ensuite séparées selon leur taille par électrophorèse sur gel. Ces protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer sa taille, sa concentration, les variations de cette concentration, effectuer des comparaisons de concentrations entre différents groupes...

LE GOFFE (Claire) –Le monoxyde d’azote en odontologie. –77F ; ill. ; 87 ref. ; 30cm.

(Thèse : Chir. Dent. ; Nantes ; 2013)

RESUME

Le NO est aujourd’hui reconnu pour participer aux fonctions physiologiques et physiopathologiques de nombreux systèmes (cardiovasculaire, pulmonaire, rénal, digestif...), ce qui lui vaut d’être étudié dans presque tous les domaines de la médecine.

Cette thèse a pour objectif de montrer que l’étude du NO suscite aussi un intérêt en odontologie car il intervient dans des processus physiologiques et pathologiques du parodonte et de la pulpe dentaire.

La diversité des effets du NO est liée à sa chimie complexe. Le NO est, en effet, à l’origine de différentes espèces chimiques dont la nature va dépendre de sa source de production et auront, de ce fait, des cibles et des effets cellulaires différents.

L’analyse de la littérature permet d’établir les bases de la participation du NO dans les maladies parodontales. Elles s’appuient sur 3 constats: 1) La production de NO est augmentée au cours de l’inflammation parodontale 2) l’inhibition de la production du NO dans des modèles de parodontite modifie la progression et les conséquences de l’inflammation parodontale 3) L’application de donneur de NO, diminue l’inflammation parodontale et les dommages osseux consécutifs. Ses rôles précis dans la pathogénèse des parodontites restent néanmoins à déterminer.

Certaines études suggèrent que le NO participe aux fonctions physiologiques de la pulpe et notamment à la régulation de la circulation sanguine pulpaire. De plus, de rares données semblent indiquer que le NO participe au processus inflammatoire pulpaire et qu’il pourrait être impliqué dans la mise en place des mécanismes de réparation dentinaire.

Une meilleure compréhension des mécanismes faisant intervenir le NO et ses dérivés dans les processus physiologiques et physiopathologiques de l’organe dentaire pourrait permettre de définir de nouvelles cibles pharmacologiques et ainsi d’améliorer la prise en charges des patients en odontologie.

RUBRIQUE DE CLASSEMENT : Odontologie

MOTS CLES :

- Monoxyde d’azote
- Peroxynitrite
- NO Synthase
- Inflammation
- Parodontite
- Pulpe dentaire
- Pulpite

- Inflammation

MOTS CLES MESH

- Nitric Oxide
- Peroxynitrite
- Nitric Oxyde Synthase

- Periodontitis
- Dental Pulp
- Pulpitis

JURY

Président : Professeur Assem SOUEIDAN

Directeur : Professeur Brigitte ALLIOT-LICHT

Assesseur : Docteur Xavier STRUILLLOU

Assesseur : Docteur Cécile DUPAS