Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Charlotte THOMAS

Le 14 décembre 2021

Microbiote oral et Obésité : de la signature du microbiote oral dysbiotique chez l 'Homme à la causalité chez la souris.

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIO-INFORMATIQUE, GENOMIQUE ET BIOLOGIE DES SYSTEMES**

Unité de recherche :
I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par
Vincent BLASCO-BAQUE et Sara LAURENCIN-DALICIEUX

Jury

Mme Catherine BISSON, Rapporteure
M. Frederic CUISINIER, Rapporteur
Mme Valérie ROGER, Examinatrice
Mme Catherine NABET, Examinatrice
M. Vincent BLASCO-BAQUE, Directeur de thèse
Mme Sara LAURENCIN-DALICIEUX, Co-directrice de thèse

Remerciements

N’étant pas une adepte des phrases à rallonge ou des envolées lyriques, il semble malgré tout difficile de résumer 12 années d’études universitaires, ces rencontres et ces à-côtés sur une seule page.

Toi qui lis ces remerciements, il est fort possible que tu sois membre de ma famille. Tu es ce socle, cette colonne vertébrale qui m’accompagne à chaque instant de la vie. A la fois pudique, sensible mais aussi dure et intransigeante je ne suis pas toujours facile à vivre. Mon parcours est en grande partie grâce à toi car je n’aurais pas tenu jusqu’au bout sans toi. Pour toutes les choses que je ne te dis pas assez … Merci pour ton soutien sans faille.

Toi qui lis ces remerciements, tu es surement un ami avec qui j’ai partagé de bons et mauvais moments. Ami d’enfance, du foyer de bonnes sœurs, de fac, d’internat, du handball ou d’autres horizons, tu as participé directement ou indirectement à cette aventure. Tu m’as permis de maintenir un équilibre quelque fois bancal. Merci pour tous ces moments et vivement les prochains !

Toi qui lis ces remerciements, tu es probablement un de mes directeurs de thèse. Certains en ont 1 seul d’autres ont la « chance » d’en avoir 2 ! Pour moi, cela a été le combo gagnant : 2 caractères différents, 2 organisations différentes, 2 agendas différents à gérer mais finalement 2 personnes complémentaires avec lesquelles je suis fière d’avoir réalisé cette thèse. Tu as été un pilier dans ce travail, un soutien moral et un allié indéfectible dans cette quête interminable vers une carrière hospitalo-universitaire. Tu es une personne en qui j’ai énormément d’estime. Merci pour tout !

Toi qui lis ces remerciements, tu es peut-être membre de l’équipe de la fac dentaire ou bien du laboratoire de recherche. La fac dentaire était un terrain connu, l’Inserm fut une découverte ! Tu m’as fait découvrir le monde de l’animalerie et de la bactério, tu m’as aidé et formé à différentes manips de labo, ou bien tu m’as interrogé sur la formulation de la question scientifique ou lors d’une de mes présentations au labmeeting. Tu as contribué de près ou de loin à ce travail, je te remercie sincèrement pour ton aide.

Je remercie également les membres du jury, rapporteurs et examinateurs, d’avoir accepté de juger ce travail.

Table des matières :

Abréviations 6
Résumé 9
Introduction 13
I- L'Obésité 15
1. Généralités 15
1.1. Épidémiologie 15
1.1.1. Définition 15
1.1.2. Prévalence 16
1.1.3. Facteurs de risque et comorbidités 17
1.1.4. Impact économique 18
1.2. Le tissu adipeux 18
1.2.1. Généralités 18
1.2.2. Distribution anatomique 19
1.2.3. Dimorphisme sexuel 20
1.2.4. Composition 20
1.2.5. Fonctions 22
2. Tissu adipeux blanc et Obésité 26
2.1. Facteurs à l'origine de l'inflammation 26
2.2. Conséquences de l'inflammation chronique 29
3. Moyens de prise en charge de l'obésité 31
3.1. Thérapeutiques actuelles 31
3.1.1. Modification du mode de vie 31
3.1.2. Les médicaments « anti-obésité » 31
3.1.3. La chirurgie bariatrique 32
3.2. Microbiote intestinal : nouveau paradigme de l'obésité 37
II- Le Microbiote oral 41
1. Généralités 41
1.1. Caractéristiques et composition 41
1.2. La salive : élément indispensable au maintien de l'homéostasie 43
1.3. Méthodes d'investigation du microbiote oral 46
1.3.1. Moyens d'exploration du microbiote oral 46

1.3.2. Analyse statistique comparative des microbiotes 48
1.3.3. Évaluation de la diversité microbienne 51
2. Dysbiose du microbiote oral 52
2.1. Définition 52
2.2. Le Biofilm 53
2.3. Pathologies orales en lien avec une dysbiose orale 55
2.3.1. Carie 56
2.3.2. Parodontite 57
2.3.3. Dysbiose du microbiote oral et inflammation systémique : rôle de la translocation bactérienne. 61
3. Cavité orale et Obésité 64
3.1. Caries et Obésité 64
3.2. Parodontites et Obésité 64
4. Microbiote oral dysbiotique et Obésité 65
4.1. Composition du microbiote oral chez les personnes obèses 65
4.2. Microbiote oral dysbiotique et obésité : un lien de causalité ? 66
III- Partie expérimentale 68
1. Résultats expérimentaux 1 : 69
1.1. Introduction : 70
1.2. Matériels et Méthodes : 73
1.2.1. Conception de l'étude 73
1.2.2. Cadre de l'étude 73
1.2.3. Participants 73
1.2.4. Variables et mesures des données 74
1.2.5. Gestion et analyse des données 75
1.3. Résultats : 77
1.4. Discussion 90
1.5. Conclusion 93
2. Résultats expérimentaux 2 : 94
2.1. Introduction : 95
2.2. Matériel et méthodes 97
2.3. Résultats : 105
2.4. Discussion 118
2.5. Conclusion 122

IV- Conclusion - Perspectives 124
Annexes 127
Liste des figures et tableaux 139
Réferences bibliographiques 142
Publications issues de la thèse 157

ABRÉVIATIONS

ACoP : Analyse en Coordonnées Principales

ACP : Analyse en Composantes Principales

ACK : Ammonium Chlorure Potassium

AGL : Acides Gras Libre

AI-2 : Auto-Inducers-2

AQP-7 : Aquaporine 7

ATGL : Adipocyte Triglycéride Lipase

BOP : Bleeding On Probing (saignement gingival au sondage)

BSA : Bovine Serum Albumin

CCL2 : Chemiokine Ligand 2

CMC : Carboxymethylcellulose

CPP : Comité de Protection des Personnes

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF index : Decayed-Missing-Filled index / indice CAO (Carie-Absente-Obturée)

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

FABP 4 : Fatty Acid Binding Protein 4

FATP : Fatty Acid Transport Proteins

FDA : Food and Drug Administration

FDR : False Discovery Rate (Taux d'erreurs de découverte)

FIAF : Fasting Induced Adipose Factor

FSV : Fraction Stroma-Vasculaire

Fn : *Fusobacterium nucleatum*

G3P : Glycérol-3-Phosphate

GLP-1 : Glucagon Like Peptide 1

GLUT-1 : Glucose Transporter type 1

GLUT-4 : Glucose Transporter type 4

H&E : Hématoxyline et Eosine

HFD : High Fat Diet (régime alimentaire gras)

HIF-1 : Hypoxia-Inducible Factor 1

IgA : Immunoglobuline A

IgAs : Immunoglobuline A sécrétoire

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL-1β : Interleukine 1 beta

IL-6 : Interleukine 6

IL-10 : Interleukine 10

IL-17 : Interleukine 17

IKK : Inhibitor of Kappa B Kinase

IMC : Indice de Masse Corporelle

IP : Indice de Plaque

IPGTT : Intraperitoneal Glucose Tolerance Test

IPP : Inhibiteurs de la Pompe à Protons

IRS : Insulin Receptor Substrate

JAK/STAT : Janus Kinase et Signal Transducers and Activators of Transcription

JNK : c-Jun NH2-terminal Kinase

LDA : Linear Discriminant Analysis

LEfSe : Linear discriminant analysis Effect Size

LHS : Lipase Hormono-Sensible

LM : Lean Microbiota

LPL : Lipoprotein Lipase

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MCP-1 : Monocyte Chimoattractant Protein 1

MGL : Monoglycéride Lipase

MMP : Matrix Metalloproteinase (Métalloprotéinases matricielles)

MyD88 : Myeloid Differentiation protein 88

NCD : Normal Chow Diet (régime alimentaire normal)

NFS : Numération de la Formule Sanguine

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

NWS : Normo-Weighted Subjects

NWF : Normo-Weighted Females

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OF : Obese Females

OM* : Obese Males (partie expérimentale 1)

OM* : Obese Microbiota (partie expérimentale 2)

OPG : Osteoprotegerin

OS : Obese Subjects

OTU : Operational Taxonomic Unit (Unités taxonomiques opérationnelles)

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PEA : Pellicule Exogène Acquise

PFA : Paraformaldéhyde

Pg : *Porphyromonas gingivalis*

PCR : Polymérase Chain Reaction

PRG : Proline-Rich Protein

PRP : Proline-Rich Protein glycosylée

PRR : Pattern Recognition Receptors

PYY : Peptide YY

RANK-L : Receptor Activator of Nuclear factor-Kappa B Ligand

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SLPI : Secretory Leukocyte Protease Inhibitor

SOPF : Specific and Opportunistic Pathogen Free

SVF : Sérum de Veau Fœtal

Td : *Treponema denticola*

Tf : Tannerella forsythia

TG : Triglycérides

TGF-β : Transforming Growth Factor-beta

TLR-4 : Toll Like Receptor 4

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLDL : Very Low-Density Lipoprotein

RÉSUMÉ

La cavité buccale est l'hôte d'un écosystème complexe, le microbiote oral, composé principalement de bactéries, mais aussi de virus, de protozoaires et de champignons. Présentes à l'état physiologique, ces bactéries cohabitent avec le corps humain dans un état de symbiose. En cas de dysbiose (rupture de cette homéostasie) un ou plusieurs types de micro-organismes prolifèrent et prennent le dessus sur le système immunitaire. Diverses pathologies buccales peuvent alors survenir en fonction de ce déséquilibre bactérien. En plus d'avoir des répercussions locales, il peut également être impliqué dans la survenue de pathologies systémiques. La dysbiose orale peut entraîner le passage de bactéries Gram-négatives ou de métafacteurs bactériens à travers la muqueuse buccale, provoquant une inflammation locale puis systémique de bas grade appelée endotoxémie métabolique. Cette translocation bactérienne se fait par une augmentation de la perméabilité intercellulaire épithéliale induite par la dysbiose orale. Cette endotoxémie métabolique associée à une réaction immuno-inflammatoire chronique peut contribuer au développement et/ou à l'aggravation de troubles métaboliques. Cependant, le lien de causalité entre obésité et microbiote oral dysbiotique reste encore à clarifier.

L'objectif principal de ma thèse est d'identifier par quels mécanismes le microbiote oral contribue à l'obésité. Pour cela, nos travaux se sont articulés autour de deux axes : celui de la signature du microbiote oral dans l'obésité chez l'Homme et celui de la causalité de cette signature dans l'obésité. Dans un premier temps à travers une étude clinique pilote, nous avons réalisé une analyse détaillée du microbiote oral de sujets obèses et normo-pondérés atteints de parodontite. Dans un second temps, à travers une étude fondamentale originale, nous avons transféré le microbiote oral dysbiotique de femmes obèses et normo-pondérées chez des souris afin d'évaluer sa causalité dans l'obésité.

Concernant notre étude pilote, nous avons inclus 19 sujets atteints de parodontite que nous avons divisé en deux groupes : des sujets normo-pondérés avec un indice de masse corporelle (IMC) entre 20 et 25 (n=9) et des sujets obèses avec un IMC >30 (n=10). L'objectif principal de cette étude était d'analyser le statut du microbiote oral des sujets obèses en relation avec la parodontite. Les résultats ont montré que l'obésité était associée à un état parodontal plus sévère et à une abondance plus élevée du genre *Capnocytophaga*. D'autre part, le genre sexuel semble être déterminant dans le lien entre microbiote oral dysbiotique et obésité chez

les patients atteints de parodontite. L'obésité induit, de ce fait, une signature particulière du microbiote oral des femmes atteintes de parodontite *(Thomas et al, Diagnostics 2021).*

Dans un second temps, nous avons décidé d'explorer la causalité de cette signature du microbiote oral sur l'aggravation de l'obésité. Nous avons transféré le microbiote oral dysbiotique de femmes obèses dans un modèle murin. Après 5 semaines de colonisation, un régime riche en lipides a été introduit sur 2 mois afin d'induire une obésité. Nos résultats mettent en évidence que le transfert du microbiote oral de femmes obèses entraine une maladie parodontale aggravée par l'introduction du régime riche en lipides avec un infiltrat de cellules immunitaires augmenté au niveau buccal. Ceci s'accompagne d'une augmentation significative de cellules immunitaires au niveau sanguin et du tissu adipeux. On retrouve ainsi une augmentation significative de l'infiltrat macrophagique associée à une diminution significative de la fréquence d'adipocytes de faible diamètre dans le tissu adipeux sous-cutané au cours de l'obésité induite par un régime gras.

ABSTRACT

The oral cavity is the host of a complex ecosystem, the oral microbiota mainly composed of bacteria, but also of viruses, protozoa and fungi. Present in a physiological state, these bacteria cohabit with the human body in a state of symbiosis. In case of dysbiosis (rupture of this homeostasis) one or more types of microorganisms proliferate and take over the immune system. Various oral pathologies can then occur depending on the type of bacterial imbalance. Not only are the repercussions local, it can also be involved in the occurrence of systemic pathologies. Oral dysbiosis can lead to the passage of Gram-negative bacteria or bacterial meta-factors through the oral mucosa, causing low-grade local then systemic inflammation known as metabolic endotoxemia. Bacterial translocation from the mouth occurs through an increase in epithelial intercellular permeability induced by oral dysbiosis. This metabolic endotoxemia associated with a chronic immuno-inflammatory reaction contributes to the development and/or aggravation of metabolic disorders. However, the link between obesity and dysbiotic oral microbiota remains to be clarified.

The main objective of my thesis is to identify by which mechanisms the oral microbiota contributes to obesity. To this end, our work is articulated around two axes: that of the oral microbiota signature in obesity in humans and that of the causality of this signature in obesity. First, through a clinical pilot study, we performed a detailed analysis of the oral microbiota of obese and normo-weighted subjects with periodontitis. Secondly, through an original fundamental study, we transferred the dysbiotic oral microbiota of obese and normo-weighted women to mice in order to evaluate its causality in obesity.

Concerning our clinical pilot study, we included 19 subjects with periodontitis and divided them into two groups: normo-weighted subjects with a body mass index (BMI) between 20 and 25 (n=9) and obese subjects with a BMI >30 (n=10). The main objective of this study was to analyze the status of the oral microbiota of obese subjects in relation to periodontitis. The results showed that obesity was associated with a more severe periodontal condition and a higher abundance of the genus *Capnocytophaga*. Also, sex gender seems to be a determinant in the link between dysbiotic oral microbiota and obesity in patients with periodontitis. Obesity therefore, induces a particular signature of the oral microbiota of women with periodontitis (*Thomas et al, Diagnostics 2021*).

Secondly, we decided to explore the causality of this oral microbiota signature on the aggravation of obesity. We transferred the dysbiotic oral microbiota from obese women into a mouse model. After 5 weeks of colonization, a high-fat diet was introduced over 2 months to induce obesity. Our results show that the oral microbiota transfer from obese women leads to periodontal disease that is aggravated by the high-fat diet with an increased immune cell infiltrate in the mouth. This is accompanied by a significant systemic increase in immune cells in the blood and adipose tissue. We found a significant increase in the macrophagic infiltrate associated with a significant decrease in the frequency of small diameter adipocytes in the subcutaneous adipose tissue during obesity induced by a fatty diet.

INTRODUCTION

Pourquoi certains mangent énormément et ne prennent quasiment aucun poids alors que d'autres en prennent au moindre écart ?

Des millions d'euros sont dépensés pour la prise en charge de l'obésité avec des résultats qui s'avèrent peu satisfaisants depuis 20 ans. En effet, malgré les différents moyens de prévention et de prise en charge, la prévalence de l'obésité ne cesse d'augmenter dans le monde. Et si finalement, il existait des acteurs encore non pris en compte dans l'obésité ? Parmi eux, est-ce que le microbiote oral en ferait partie ?

Depuis quelques années, la causalité du microbiote intestinal a été mise en évidence et démontrée dans l'obésité par transfert de microbiote sur le modèle animal. Les personnes obèses sont caractérisées par une dysbiose du microbiote intestinal qui potentialise l'endotoxémie métabolique et le développement de l'obésité. Ainsi, une nouvelle approche thérapeutique prometteuse, la transplantation fécale a émergé. Elle consiste à l'introduction du microbiote fécal d'un individu normo-pondéré dans l'intestin d'un individu obèse afin de remédier à la dysbiose consécutives à la pathologie (l'obésité).

Comme l'intestin, la cavité buccale abrite un autre écosystème majeur, le microbiote oral qui communique intensément avec l'ensemble de notre organisme. Une dysbiose orale provoque un état inflammatoire localisé qui peut contribuer au maintien d'une inflammation systémique chronique de bas grade et au développement de désordres systémiques *via* la translocation bactérienne depuis la cavité orale. Les personnes obèses sont caractérisées par un microbiote oral dysbiotique. Cependant, à ce jour, le lien de causalité entre microbiote oral dysbiotique et obésité n'a pas encore été établi et les recherches sur l'identification des espèces bactériennes orales responsables sont encore rares. Si différentes proportions de certaines espèces bactériennes ont été observées, leur causalité et leurs mécanismes d'action dans l'obésité restent à clarifier et le lien entre obésité et dysbiose oral davantage exploré afin d'identifier une potentielle signature du microbiote oral dans l'obésité.

L'objectif principal de ma thèse est d'identifier par quels mécanismes moléculaires le microbiote oral contribue à l'obésité. Pour cela, nos travaux se sont articulés autour de deux axes alimentés par 2 questions : celui de la signature du microbiote oral dans l'obésité chez l'Homme et celui de la causalité de cette signature dans l'obésité.

Dans un premier temps à travers une étude clinique pilote, nous avons réalisé une analyse détaillée du microbiote oral de sujets obèses et normo-pondérés atteints de parodontite. Dans un second temps, à travers une étude fondamentale originale, nous avons transféré le microbiote oral dysbiotique de femmes obèses et normo-pondérées chez des souris femelles afin d'évaluer sa causalité dans l'obésité.

I- L'OBÉSITÉ

1. GENERALITES

1.1. Épidémiologie

1.1.1. Définition

Depuis 1998, l'obésité est reconnue comme « maladie chronique » par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Elle est définie comme une accumulation anormale ou excessive de graisse résultant d'un déséquilibre entre l'apport et les dépenses énergétiques, et pouvant nuire à la santé de l'individu. Chez l'adulte, l'indicateur le plus communément utilisé pour estimer la masse grasse est l'indice de masse corporelle (IMC) (Tableau 1). Il correspond au poids en kilogrammes divisé par le carré de la taille exprimée en mètres (kg/m²). L'IMC s'applique aux adultes des deux sexes et de toutes les tranches d'âge. On parle de surpoids lorsque l'IMC est compris entre 25 et 30 et d'obésité lorsqu'il dépasse 30 [1].

IMC (en kg/m^2)	Classification
< 16,5	Dénutrition
Entre 16,5 et 18,5	Maigreur
Entre 18,5 et 25	Poids « normal »
Entre 25 et 30	Surpoids
Entre 30 et 35	Obésité modérée
Entre 35 et 40	Obésité sévère
≥ 40	Obésité morbide

Tableau 1 : Seuils de corpulence en fonction de l'IMC chez l'adulte, d'après l'OMS

Cependant, les limites de cette mesure résident dans le fait que l'IMC se base principalement sur une population de type européenne alors qu'il existe une grande variabilité inter-populationnelle dans le pourcentage de masse grasse pour une valeur d'IMC donné, liée en

partie à l'âge, au sexe et à l'origine ethnique. De plus, l'IMC ne tient pas compte de la répartition des graisses dans l'organisme alors que cela peut être la cause de certaines pathologies associées à l'obésité. Il existe également d'autres types de mesures comme le tour de taille qui permet de déceler plus précisément un excès d'adiposité au niveau de l'abdomen, ou bien le ratio « tour de taille/tour de hanches » pour avoir une meilleure idée de la répartition de la masse grasse corporelle. Ces mesures nous renseignent sur un développement anormal de tissu adipeux et sont seulement utilisées en complément de l'IMC, qui reste l'outil de prédilection retenu dans les études médicales sur l'obésité [2,3].

1.1.2. Prévalence

De nos jours, l'évolution de cette pathologie est considérée comme pandémique et est un problème majeur de santé publique. En France, les résultats de la dernière enquête nationale ObÉpi réalisée en 2012 ont montré une augmentation continue du surpoids et de l'obésité chez les adultes de plus de 18 ans avec 15 % d'obèses, soit près de deux fois plus qu'en 1997 (8%)[4].

Au niveau mondial si l'obésité est en progression dans les pays industrialisés, elle l'est également dans des régions telles que l'Afrique sub-saharienne considérées comme épargnées jusqu'à présent. Selon OMS, en 2017, 1,9 milliard de personnes, soit 39% de la population adulte mondiale, étaient considérées comme en surpoids avec parmi elles 650 millions d'obèses. L'augmentation de l'obésité touche, non seulement, les populations adultes, mais aussi les enfants. Elle concerne toutes les tranches d'âge, tous les groupes socio-économiques et également toutes les origines ethniques (Figure 1) [5,6]. Si les tendances se poursuivent, d'ici 2030, plus de la moitié de la population adulte mondiale (57,8% soit 3,3 milliards de personnes) pourrait être en surpoids ou obèse [7].

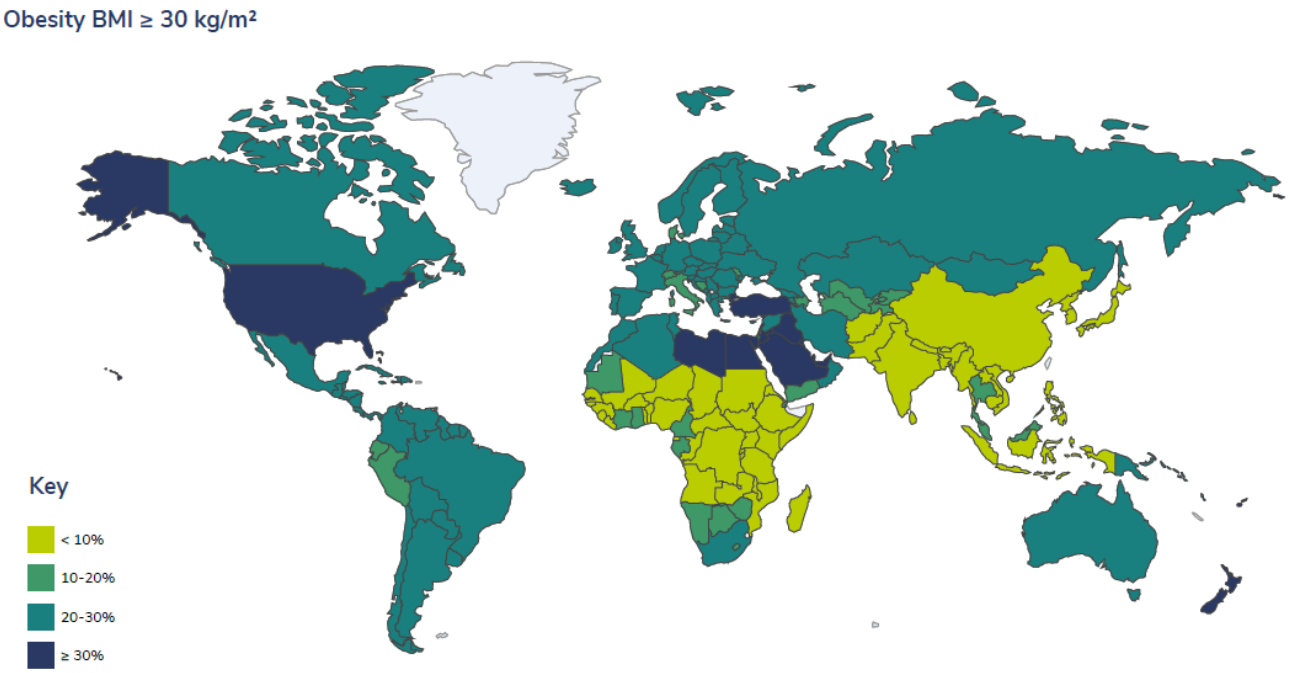


Figure 1 : Estimation de la prévalence de l'obésité chez les adultes au niveau mondial en 2017 [8]

1.1.3. Facteurs de risque et comorbidités

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre l'apport et les dépenses énergétiques. Les facteurs en cause sont multiples et ne sont pas encore tous identifiés. Plus de 300 polymorphisme mono-nucléotidiques ont été identifiés dans les études explorant le génome des individus obèses[9]. Il semble exister une prédisposition génétique. Cependant, à elle seule, elle n'est pas suffisante pour entrainer une obésité. L'implication de facteurs environnementaux, comme la pauvreté et l'inégalité sociale, est également déterminante dans les mécanismes de l'obésité. L'augmentation rapide de la prévalence de l'obésité est étroitement liée à une alimentation hypercalorique associée à une modification des modes de vie avec une augmentation de la sédentarité (activité physique réduite, prédominance du travail sur ordinateur, dépendance aux technologies informatiques dans les loisirs…)[10]. Dans les pays en développement cette augmentation est principalement due à une « occidentalisation » de ce mode de vie. D'autres facteurs sont également associés à la prise de poids comme certains médicaments (antidépresseurs par exemple), le stress, le manque de sommeil, le sevrage tabagique mais également la composition du microbiote intestinal [11].

L'obésité est une maladie chronique qui favorise l'apparition de comorbidités. Le risque étant d'autant plus important que l'IMC est élevé. L'obésité sévère ou morbide (35 ≤ IMC < 40 ou

IMC ≥ 40) augmente le risque de développement de pathologies chroniques cardio-métaboliques telles que le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, la dyslipidémie, de maladies hépatiques et respiratoires, mais aussi de certains cancers. Il existe également des répercussion psychologiques et sociales de cette pathologie [5,11].

L'OMS affirme qu'au moins 2,8 millions de personnes dans le monde meurent chaque année des conséquences du surpoids ou de l'obésité, le taux de mortalité augmentant avec l'IMC [12]. L'année de vie ajustée par rapport à l'invalidité est une mesure du poids global des maladies, elle est exprimée en nombre d'années perdues pour cause de mauvaise santé. À l'échelle mondiale, concernant le surpoids et l'obésité, il est estimé à 35,8 millions (soit 2,3%) d'années de vie ajustées par rapport à l'invalidité [1].

1.1.4. Impact économique

L'obésité a un impact économique important en termes de coûts directs et indirects. En France, la consommation totale de soins médicaux d'un individu obèse a été estimée à 2 500 euros [13]. Aux États-Unis, en 2014, il était estimé à 1901 dollars US pour une seule personne obèse [14]. En 2016, ces coûts médicaux s'élevaient à 209,7 milliards de dollars soit plus de 20 % de l'ensemble des dépenses de santé annuelles aux États-Unis. Les coûts indirects de l'obésité, liés entre autres à la perte de productivité, représentent, eux, 66 milliards de dollars par an. Cela correspond à un coût total (direct et indirect) d'environ 275 milliards de dollars par an [15].

1.2. Le tissu adipeux

1.2.1. Généralités

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif lâche. Il existe deux grands types de tissu adipeux possédant des fonctions différentes : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux blanc est le tissu adipeux le plus abondant chez l'Homme contrairement au tissu adipeux brun qui est présent en quantité relativement faible.

Le tissu adipeux brun, retrouvé en quantité plus importante chez les enfants joue un rôle dans la thermogénèse. La persistance chez l'adulte de ce tissu adipeux brun, localisé à proximité du système nerveux central avec lequel il pourrait interagir, serait inversement corrélé avec l'IMC et serait impliqué dans l'homéostasie métabolique [16]. Le tissu adipeux blanc a un rôle central dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Il est également considéré comme un organe endocrine à part entière avec une activité sécrétoire intense.

Nous nous intéresserons par la suite uniquement aux principales caractéristiques du tissu adipeux blanc à l'état physiologique. En effet, le tissu adipeux blanc est l'organe cible de l'obésité.

1.2.2. Distribution anatomique

Le tissu adipeux blanc se répartit dans l'organisme sous la forme de dépôts, dont les 2 principaux sont le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral. Le tissu adipeux sous-cutané est localisé entre les muscles et la peau mais aussi entre les fascias musculaires alors que le tissu adipeux viscéral est plus profond et entoure les viscères. Chez les sujets humains, le tissu adipeux viscéral est généralement représenté par les dépôts omental et mésentérique et par le dépôt périgonadique chez les rongeurs. Le tissu adipeux sous-cutané est représenté par les dépôts abdominaux, fessiers et fémoraux chez l'Homme et par le dépôt inguinal chez les rongeurs [17,18].

Il a été observé qu'une accumulation de dépôts de graisse viscérale était corrélée à une susceptibilité accrue aux complications métaboliques (maladies cardio-vasculaires, résistance à l'insuline, diabète de type 2), tandis que le tissu adipeux sous-cutané (en particulier le glutéo-fémoral) est associé à une réduction du risque métabolique et pourrait être un facteur de protection contre les effets néfastes de l'obésité [19–22]. Cela peut s'expliquer en partie par les caractéristiques différentielles de ces 2 tissus. Le tissu adipeux viscéral a une capacité de stockage et de prolifération moins importante que le tissu adipeux sous-cutané. Face à une balance énergétique positive persistante, cela conduit à un dépôt ectopique de lipides dans d'autres tissus, à la lipotoxicité et à la résistance à l'insuline [17,23].

1.2.3. Dimorphisme sexuel

La proportion ainsi que la distribution du tissu adipeux sont influencées par le dimorphisme sexuel. En général, les femmes présentent une adiposité plus élevée que les hommes : elle représente seulement 10 à 15 % du poids corporel chez l'homme alors qu'elle est de 20 à 30% chez la femme. Les hommes ont tendance à accumuler plus de graisse viscérale (10-20% contre 5-8% chez les femmes) ce qui correspond à un phénotype androïde, fortement corrélé à un risque de complication métabolique [24]. Les femmes, elles, accumulent plus de graisse dans le dépôt sous-cutané, particulièrement dans la région glutéo-fémorale (phénotype gynoïde) ; une caractéristique qui les protège des conséquences négatives associées à l'obésité et aux complications métaboliques. Cependant après la ménopause, le dépôt et l'accumulation de graisse se déplacent vers le dépôt viscéral et s'accompagne parallèlement d'une augmentation du risque métabolique, semblable à celui observé chez les hommes [17,23,25].

Des données suggèrent que cette répartition pourrait être principalement dépendante des hormones sexuelles [26]. Les œstrogènes, directement ou par l'activation de leurs récepteurs (α2-adrénergique et β-adrénergique) sur les adipocytes et dans les tissus adipeux, facilitent le dépôt et la fonction des tissus adipeux. Des données suggèrent que les œstrogènes augmentent le tonus sympathique de manière différenciée selon les dépôts de tissu adipeux, favorisant l'accumulation de lipides dans le dépôt sous-cutané chez les femmes (plus de récepteurs α2-adrénergiques que de β-adrénergiques) et le dépôt de graisse viscérale chez les hommes (plus de récepteurs β- que d'α2-adrénergiques). Au niveau de la fonction adipocytaire, les œstrogènes et leurs récepteurs influencent l'expansibilité des cellules adipeuses, augmentant cette expansibilité dans le dépôt sous-cutané et l'inhibant dans le dépôt viscéral [23].

1.2.4. Composition

Le tissu adipeux blanc est composé d'adipocytes et de la fraction non-adipocytaire, appelée également fraction stroma-vasculaire (FSV) (Figure 2). Les adipocytes sont les principaux composants cellulaires du tissu adipeux. Ce sont des cellules caractérisées par une vacuole lipidique unique qui occupe la majorité du cytoplasme, repoussant le noyau en périphérie contre la membrane plasmique. La vacuole lipidique également appelée gouttelette lipidique, contient principalement des triglycérides. Elle a une taille qui peut varier de 30 à 150 μm

selon sa teneur en lipides. Les adipocytes assurent le rôle de synthèse et d'hydrolyse des triglycérides, et ils présentent également une fonction sécrétoire avec la libération de plusieurs adipokines. La FSV regroupe un ensemble hétérogène de types cellulaires comprenant des pré-adipocytes, des fibroblastes, des cellules immunitaires (macrophage et lymphocytes), des cellules endothéliales et des cellules progénitrices. Elle joue un rôle dans le renouvellement adipocytaire ainsi que dans l'homéostasie tissulaire [24].

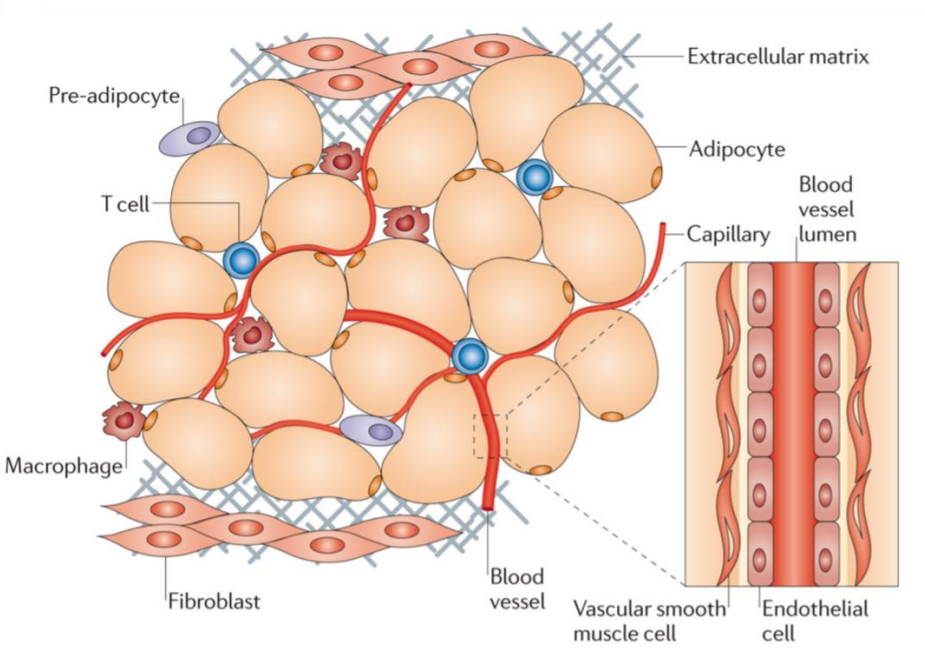


Figure 2 : Représentation de la composition du tissu adipeux blanc [27]

1.2.5. Fonctions

Fonction de réserve énergétique :

- La lipogenèse et synthèse des triglycérides : stockage énergétique

Après un repas et une augmentation de l'insuline sanguine, la lipogenèse est activée dans les adipocytes et conduit à la transformation et au stockage des acides gras en triglycérides (TG). La synthèse des triglycérides au sein de l'adipocyte se fait à partir de 2 principaux substrats : les acides gras non estérifiés et le glucose, préalablement activés respectivement en Acyl-CoA et en glycérol-3-phosphate (G3P) (Figure 3).

- La principale source de lipides des adipocytes provient du captage des triglycérides circulants (issus de l'alimentation). Les triglycérides circulants sont liés à des protéines de transports tels que les chylomicrons et les Very Low Density Lipoproteins (VLDL). Puis la lipoprotéine lipase (LPL) hydrolyse les triglycérides des lipoprotéines en acides gras et 2-monoacylglycérol. Le glycérol regagne le foie. Les acides gras libres (AGL) entrent dans l'adipocytes via les FATPs (Fatty Acid Transport Proteins) et sont ensuite convertis en Acyl-CoA par l'Acyl-CoA synthase.

- L'insuline stimule l'entrée du glucose dans les adipocytes. Le glucose pénètre dans les adipocytes via les protéines transmembranaires GLUT-1 (Glucose transporter type 1) et GLUT-4 (Glucose transporter type 4). L'hydrolyse du glucose (ou glycolyse) permet la formation de G3P utilisé pour former le squelette carboné des triglycérides, et d'Acyl-CoA.

- Enfin, l'acyl-CoA et le G3P vont permettre la formation des triglycérides via l'action de plusieurs enzymes. Cette voie commence par l'estérification d'un premier Acyl-CoA sur une molécule de glycérol-3-phosphate pour former l'acide lysophosphatidique, puis d'un second Acyl-CoA pour former l'acide phosphatidique. L'acide phosphatidique est déphosphorylé pour former un diacylglycérol et le troisième Acyl-CoA est ensuite ajouté pour donner un triglycéride qui est incorporé dans la gouttelette lipidique [24].

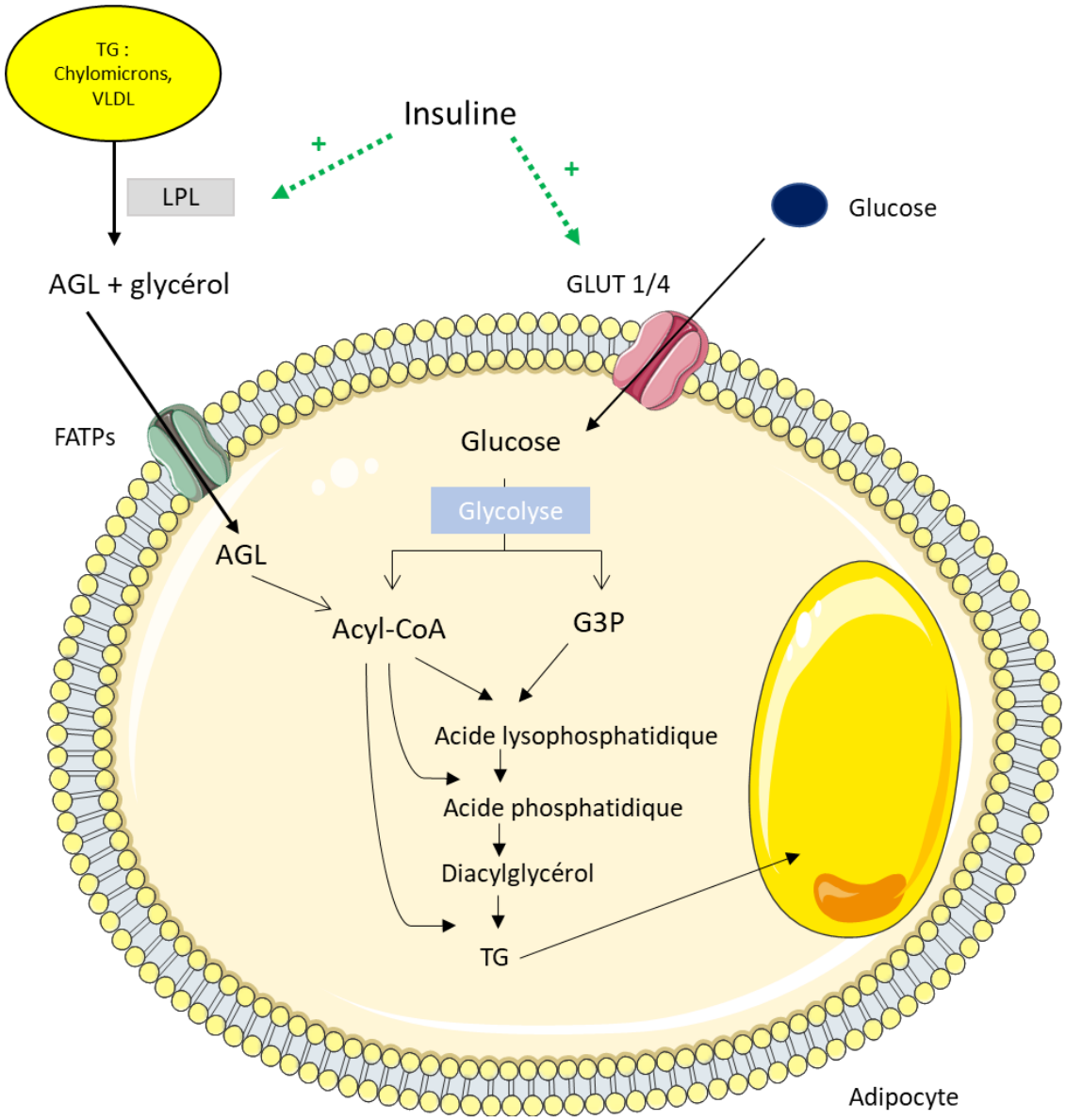


Figure 3 : Lipogenèse et synthèses de triglycérides dans l'adipocyte

- La lipolyse : source énergétique

La lipolyse permet la libération d'acides gras comme source d'énergie pour les autres tissus afin de répondre aux besoins de l'organisme. Elle est uniquement imputable aux cellules adipeuses (adipocytes). Elle permet l'hydrolyse des triglycérides contenus dans la gouttelette lipidique des adipocytes en diglycérides, puis monoglycérides afin de former des acides gras et du glycérol (Figure 4). Les acides gras libérés par ce processus vont dans le sang et sont utilisables par les autres cellules de l'organisme à des fins énergétiques. Cette voie dépend de l'action de 3 lipases principales : la lipase hormono-sensible (LHS), l'adipocyte triglycéride

lipase (ATGL) et la monoglycéride lipase (MGL). La lipolyse est stimulée par les catécholamines (comme l'adrénaline et la noradrénaline) via les récepteurs adrénergiques β1 et β2, et inhibée par le récepteur adrénergique α2 ainsi que l'insuline. Cette stimulation induit l'activation de la LHS et de ATGL puis de MGL pour la dernière étape de la lipolyse qui correspond à hydrolyser les 2-monoglycerides en acide gras et glycérol. Les acides gras et le glycérol sont libérés de l'adipocyte via le Fatty Acid Binding Proteins 4 (FABP4) et l'aquaporine 7 (AQP-7) respectivement. [24].

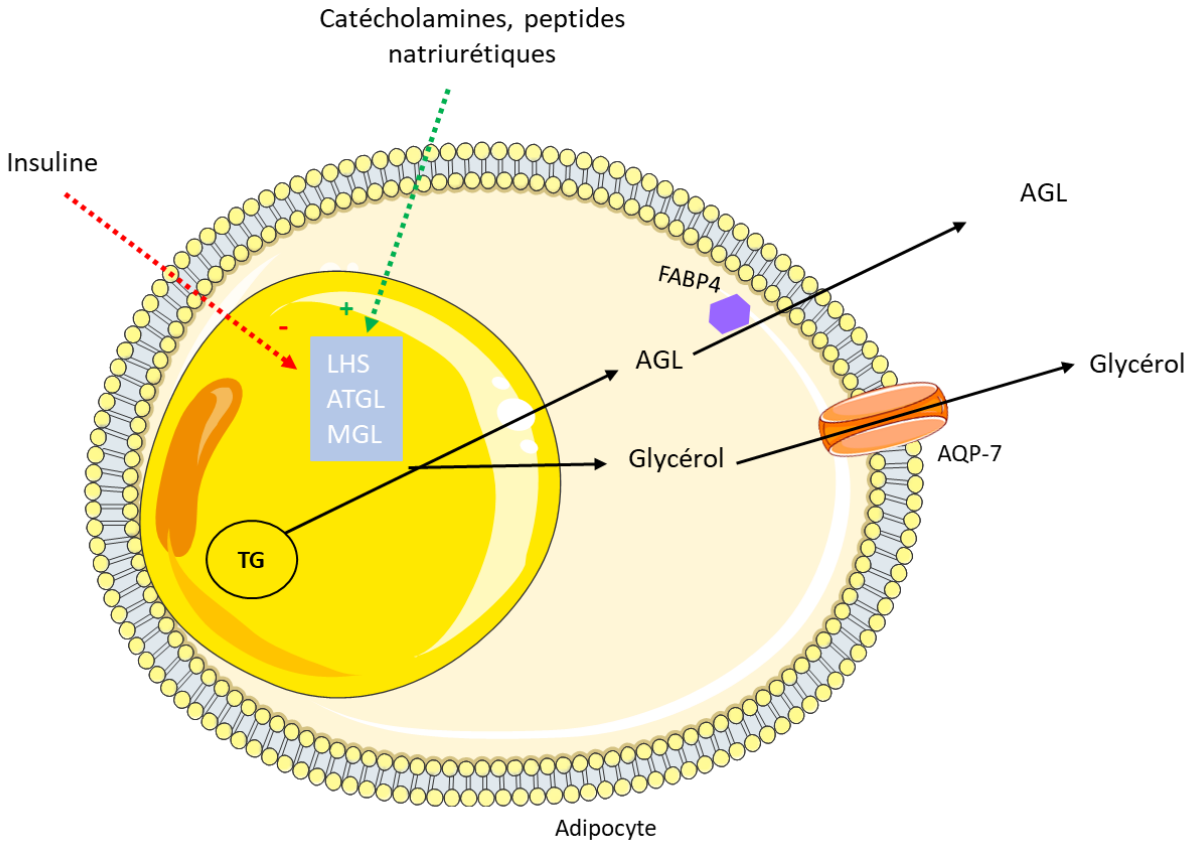


Figure 4 : Lipolyse dans l'adipocyte

Fonction sécrétrice

Le tissu adipeux fonctionne comme un organe endocrinien clé. En plus de la libération des acides gras lors de la lipolyse, il sécrète de multiples facteurs bioactifs appelés adipokines. Ces différents facteurs sont sécrétés par les adipocytes mais aussi les composants de la FSV comme par exemple les macrophages. La leptine, l'adiponectine, TNF-α et IL-6 sont des exemples d'adipokines sécrétées par le tissu adipeux (Tableau 2). Ces adipokines sont

affectées à de nombreuses fonctions physiologiques : métabolisme énergétique, prise alimentaire, réponse inflammatoire, angiogenèse… Une dérégulation de la sécrétion de ces adipokines en raison d'un dysfonctionnement du tissu adipeux peut contribuer à la pathogenèse des complications liées à l'obésité. Par exemple, les secrétions de cytokines du tissu adipeux, issues des adipocytes hypertrophiques et des cellules inflammatoires infiltrant le tissu adipeux dans le cas de l'obésité, contribuent à la mise en place d'un état pro-inflammatoire chronique de bas grade [27,28].

Adipokines	**Fonctions**	**Sécrétées par**	**Obésité**
Acides gras libres	Métabolisme lipidique	Adipocytes	Augmenté
Adiponectine	Anti-inflammatoire, sensibilité à l'insuline	Adipocytes	Diminué
Angiotensinogène	Homéostasie vasculaire	Adipocytes et FSV	Augmenté
Apeline	Sensibilité à l'insuline	Adipocytes, FSV et macrophage	Augmenté
CCL-2 (MCP-1)	Inflammation, résistance à l'insuline, athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmenté
CRP	Inflammation	FSV	Augmenté
Hormone stéroïdiennes	Métabolisme lipidique, résistance à l'insuline	Adipocytes et pré-adipocytes	Augmenté
IL-10	Anti-inflammatoire, sensibilité à l'insuline	Macrophages	Augmenté
IL-18	Inflammation, résistance à l'insuline, diminue la prise alimentaire	FSV	Augmenté
IL-1β	Inflammation, résistance à l'insuline, athérosclérose	Adipocytes et macrophages	Augmenté
IL-6	Inflammation, résistance à l'insuline, athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmenté
IL-8	Inflammation ; athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmenté
Leptine	Régulation de la prise alimentaire, l'angiogenèse et le système immunitaire	Adipocytes	Augmenté
LPL	Métabolisme lipidique	Adipocytes	Augmenté
PAI-1	Inflammation, homéostasie vasculaire	Adipocytes et FSV	Augmenté
Prostaglandines	Régule le flux sanguin, la lipolyse et la différenciation cellulaire	Adipocytes et FSV	Augmenté
Résistine	Inflammation, résistance à l'insuline	Adipocytes et macrophages	Variable
TGF-β	Adhérence, migration, croissance, différenciation cellulaire et fibrose	Adipocytes et FSV	Augmenté
Thrombospondine	Angiogenèse	Adipocyte	Augmenté
TNF-α	Inflammation, résistance à l'insuline, athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmenté

Tableau 2 : Fonctions, origines et variation au cours de l'obésité des principales adipokines [28]
(CCL-2 : Chemiokine Ligand 2 ; MCP-1 : Monocyte Chimoattractant Protein 1 ; CRP : Protein C- reactive ; IL-10 : Interleukine-10 ; IL-18 : Interleukine-18 ; IL-1β : Interleukine-1beta ; IL-6 : Interleukine-6 ; IL-8 : Interleukine-8 ; LPL : lipoprotéine lipase ; PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1 ; TGF-β : Transforming Growth Factor-beta ; TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha)

2. TISSU ADIPEUX BLANC ET OBESITE

Comme nous l'avons vu, une balance énergétique positive prolongée est à l'origine du développement de l'obésité. L'obésité se caractérise par un excès de tissu adipeux qui s'installe progressivement, parallèlement à la prise de poids. L'accroissement de la masse adipeuse repose sur une hypertrophie (augmentation de la taille) et une hyperplasie (augmentation du nombre) des adipocytes. Les mécanismes moléculaires favorisant l'un ou l'autre mode d'expansion demeurent encore flous. Dans des conditions de balance énergétique positive prolongée pour compenser le besoin de stockage accru des lipides, les lipides en excès sont stockés au sein des adipocytes préexistants contribuant à l'hypertrophie. En parallèle, l'hyperplasie des adipocytes est réalisée par le biais du recrutement progéniteur/pré-adipocytes et leur différenciation en adipocytes. Cependant chez les individus adultes, les adipocytes présentent un taux de renouvellement faible d'environ 10% par an [29] et l'hyperplasie adipocytaire semble être un processus limité. Au fur et à mesure que l'obésité s'aggrave et se chronicise, les adipocytes augmentent de taille et subissent un profond remodelage jusqu'à atteindre une limite d'expansion. L'atteinte de ce seuil critique provoque un dysfonctionnement de ces adipocytes hypertrophiques et déclenche la mise en place de plusieurs phénomènes à l'origine de l'état inflammatoire chronique de bas grade qui caractérise l'obésité [30,31].

2.1. Facteurs à l'origine de l'inflammation

Chez les personnes obèses, l'hypertrophie adipocytaire en soi entraîne une fonction adipocytaire anormale et un remodelage du tissu adipeux. Plusieurs phénomènes participent au développement et à l'entretien de l'inflammation systémique de bas grade (Figure 5) :

- Altération des capacités de stockage : avec limite d'expansion des adipocytes hypertrophiques. Ces derniers ont une capacité limitée à stocker les lipides entraînant une augmentation de ceux-ci dans la circulation sanguine. De grandes quantités de lipides circulants sont absorbées par d'autres tissus, tels que le foie, le pancréas et les muscles, ce qui peut provoquer une accumulation ectopique de lipides. De plus l'augmentation de la lipolyse conduit à une libération d'acides gras qui peuvent se lier aux récepteurs TLR-4 (Toll Like

Receptor 4) présents sur les macrophages. Cela active le facteur de transcription NF-κB et il en résulte un relargage de cytokines pro-inflammatoires comme TNF-α, IL-6 et IL-1ß. Enfin, certaines sécrétions macrophagiques (par exemple TNF-α), présentent une action lipolytique conduisant à la libération accrue d'acides gras qui stimulent les cellules inflammatoires via leur récepteur TLR-4, déclenchant ainsi un cercle vicieux qui aggrave le statut inflammatoire [30,32].

- Hypoxie et mort adipocytaire : l'hypertrophie des adipocytes entraîne une déficience de la vascularisation et induit des zones d'hypoxie au sein du tissu adipeux. Plusieurs preuves indiquent que l'hypoxie se développe au fur et à mesure que le tissu adipeux se développe en raison d'une réduction relative de la perfusion des adipocytes hypertrophiques ou d'une consommation accrue d'oxygène [33]. L'hypoxie est un déclencheur important de l'induction de l'inflammation du tissu adipeux via HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1). Cette hypoxie peut être à l'origine de la mort des adipocytes hypertrophiques contribuant ainsi à limiter le stockage et à stimuler l'infiltration macrophagique, ceux-ci venant alors s'accumuler en couronne autours des adipocytes nécrotiques afin de les phagocyter [31,34,35].

- Altération du profil de sécrétion des adipocytes : une expression et une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, l'IL-6, l'IL-1β et la protéine MCP-1 (Monocyte Chimoattractant Protein 1), également connue sous le nom de CCL2 (Chemiokine Ligand 2), ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'adiponectine sont observées. La sécrétion de MCP-1 joue un rôle clé dans la migration et l'infiltration monocytaire au sein du tissu adipeux [36]. Les cytokines inflammatoires favorisent également l'inflammation du tissu adipeux en recrutant diverses cellules immunitaires, notamment des macrophages et des lymphocytes T [18].

-Infiltration de cellules immunitaires: L'association entre les adipocytes hypertrophiques et l'augmentation de l'infiltrat immunitaire notamment de macrophages de type M1 (pro-inflammatoire) au niveau du tissu adipeux a été observée [37]. Les macrophages du tissu adipeux sont classés en deux catégories : M1, les macrophages ayant des propriétés pro-inflammatoires, et M2, macrophages associés à un profil anti-inflammatoire [38]. La sécrétion de chimiokines telle que MCP-1 sécrétée par les adipocytes hypertrophiques et macrophages joue un rôle clé dans la migration et l'infiltration monocytaire au sein du tissu adipeux [36]. Un afflux massif de monocytes a été observé dans le tissu adipeux autour des adipocytes nécrotiques, où les monocytes se transforment en macrophages M1 pro-

inflammatoires, formant une "structure en couronne". Les macrophages M1 sécrètent une variété de cytokines inflammatoires (par exemple IL-1β, TNF-α, et IL-6) contribuant à l'inflammation locale et systémique. Ces macrophages pro-inflammatoires libèrent également des chimiokines (MCP-1 par exemple) pour recruter la prochaine vague de monocytes provenant de la circulation sanguine. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes et les cellules de l'immunité favorise la multiplication de macrophages M1 pro-inflammatoires au niveau du tissu adipeux. En plus des macrophages, de nombreuses autres cellules immunitaires (par exemple, les cellules dendritiques, les mastocytes, les neutrophiles, les cellules B et les cellules T) résident dans le tissu adipeux pendant l'obésité et jouent un rôle clé dans l'augmentation de l'inflammation [18,31,39].

Enfin, il a également été décrit que la translocation de bactéries ou des facteurs de virulence comme le Lipopolysaccharide (LPS) issus de la dysbiose intestinale, peut interagir et activer les TLR-4 des macrophages et des adipocytes déclenchant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [40].

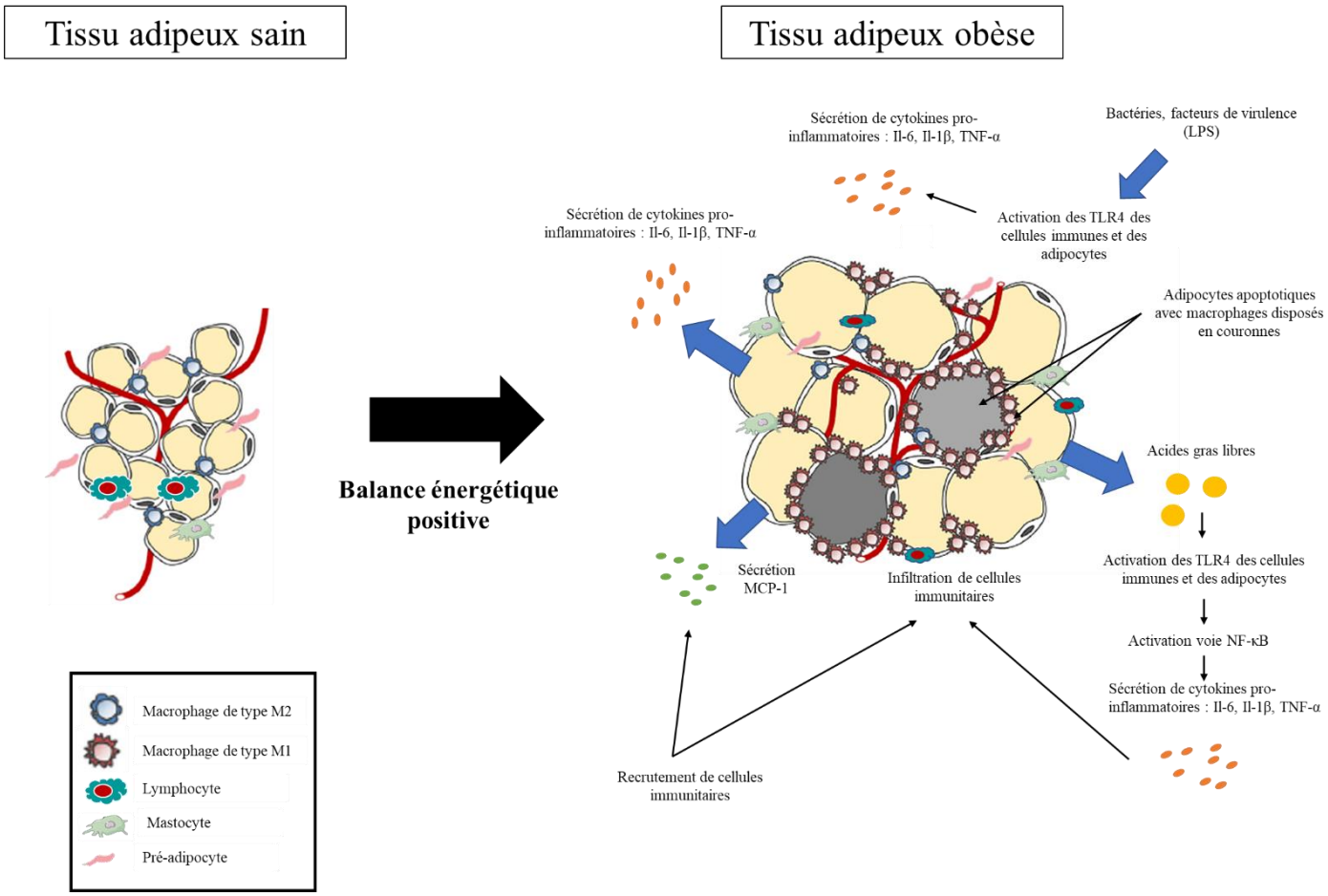


Figure 5 : Facteurs à l'origine de l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité (d'après [18]modifiée)

2.2. Conséquences de l'inflammation chronique

La composante inflammatoire de l'obésité peut avoir des répercussions sur la régulation de la sensibilité à l'insuline ou participer à la mise en place d'une autre altération qui affecte le tissu adipeux obèse pathologique : la fibrose.

Fibrose du tissu adipeux :

Au cours de l'obésité, un remodelage actif de la matrice extra-cellulaire (structure composée en majorité de fibres de collagène) se fait afin de répondre à l'expansion du tissu adipeux. À terme, un état fibrotique se met en place. La fibrose est définie par un accroissement de la composante fibrillaire de la matrice extracellulaire, notamment par l'augmentation de la proportion des fibres de collagène. Cette fibrose du tissu adipeux provoque une limitation de sa plasticité, de son expansibilité et peut être responsable du dysfonctionnement du tissu adipeux. Les facteurs et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués responsables de cela sont encore mal identifiés. L'inflammation chronique retrouvée dans l'obésité a été décrite comme un phénomène pouvant favoriser la fibrose. Les macrophages M1 pro-inflammatoires libèrent des cytokines telles que le TGF-β (Transforming Growth Factor-beta), TNF-α et IL-1β qui sont pro-fibrotiques et qui peuvent être à l'origine d'altérations profondes et du remodelage de la matrice [41]. Ils sécrètent aussi IL-6 et IL-10, connues également pour favoriser l'activation du TGF-β. Enfin, l'hypoxie semble également jouer un rôle dans la mise en place de cette fibrose [24,42,43].

Désordres métaboliques

La chronicisation de l'obésité précipite un remodelage pathologique du tissu adipeux. Ce remodelage pathologique du tissu adipeux provoque différentes altérations locales favorisant une inflammation systémique et l'apparition de désordres métaboliques (Figure 6).

Un nombre croissant de preuves révèle un rôle clé des TLR, principalement TLR-4, dans le renforcement et le maintien de l'inflammation et de la résistance à l'insuline associés à l'obésité (260). Les taux sériques élevés d'acides gras et de facteurs pro-inflammatoires, la présence de macrophages dans de nombreux tissus, ainsi que le fait que TLR-4 soit largement exprimé dans les tissus humains (y compris le foie, le tissu adipeux, les muscles squelettiques, le pancréas, les reins, le cerveau et la muqueuse buccale), font du tissu adipeux un régulateur

majeur de l'inflammation systémique et de la résistance à l'insuline liées à l'obésité. En effet, l'activation de TLR-4 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1β et TNF-α) liée à l'obésité initient des cascades de signalisation qui activent les voies JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase) et IKK (Inhibiteur de KappaB Kinase) libérant par la suite des médiateurs pro-inflammatoires. IKK et JNK sont également connus pour inhiber l'action de l'insuline à travers la phosphorylation de la sérine et l'inhibition des protéines adaptatrices de la signalisation de l'insuline, IRS-1/2 (Insulin Receptor Substrate 1 et 2). Ceci interfère donc sur le couplage IRS-récepteur de l'insuline, favorise la dégradation de IRS et réduit la signalisation de l'insuline en aval. De plus, les adipocytes hypertrophiques présentent une lipolyse augmentée en lien avec une résistance à l'insuline ce qui entrainent une augmentation de dépôts ectopiques d'acides gras. L'accumulation de dépôts de graisse ectopique dans d'autres organes et/ou tissus (foie, muscles squelettiques, pancréas par exemple) favorise l'insulinorésistance et l'inflammation propres à chaque tissu et est responsable à long terme d'un dysfonctionnement métabolique et du développement de pathologies métaboliques correspondant aux comorbidités liées à l'obésité (diabète de type 2, stéatose hépatique, maladies cardio-vasculaires…)[31,38,39,44–46].

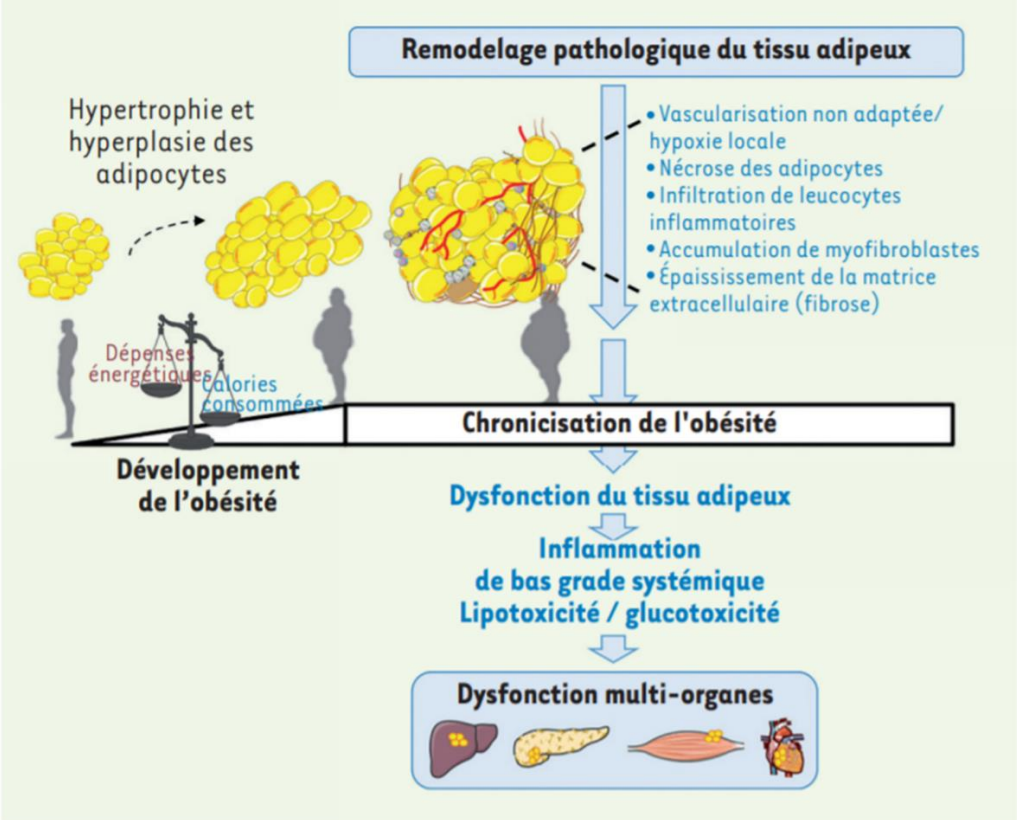


Figure 6 : Contribution du tissu adipeux dans la mise en place des maladies cardio-métaboliques associées à l'obésité [43].

3. MOYENS DE PRISE EN CHARGE DE L'OBESITE

3.1. Thérapeutiques actuelles

Le traitement de l'obésité a pour objectif la perte de poids et le maintien de celle-ci dans le temps. Il existe différentes méthodes selon le degré d'obésité. À l'heure actuelle, trois options thérapeutiques sont proposées aux personnes obèses : le changement du mode de vie, la pharmacothérapie et la chirurgie bariatrique.

3.1.1. Modification du mode de vie

La première approche concerne une modification du mode de vie comprenant une réduction de l'apport calorique associée à la pratique d'activité physique afin d'obtenir une balance énergétique négative. Cet effort doit se maintenir sur une période suffisamment longue afin d'utiliser l'énergie stockée et ainsi perdre du poids. La principale difficulté est de réussir à maintenir cet effort sur le long terme et la reprise de poids est fréquente. Les modifications du mode de vie entraînent une perte de poids d'environ 5 à 10%, généralement reprise dans les 2 années qui suivent. Un accompagnement pluridisciplinaire ainsi qu'une approche cognitivo-comportementale sont indispensables pour assurer la réussite et éviter la reprise de poids [47,48].

3.1.2. Les médicaments « anti-obésité »

La deuxième approche est médicamenteuse avec des traitements « anti-obésité » qui peuvent cibler la prise alimentaire ou l'absorption des nutriments (en particulier celle des lipides). Elle est indiquée pour deux catégories de personnes : les personnes avec un IMC ≥ 28 présentant une ou plusieurs complications métaboliques et les obèses (IMC ≥ 30). Par le passé, de nombreux médicaments anti-obésité ont été retirés du marché en raison d'effets indésirables graves à long terme. Par exemple en 2020, la Food and Drug Administration (FDA) américaine a demandé le retrait de la Locarserine du fait de l'augmentation du risque de cancers et d'effets indésirables psychiatriques. Actuellement, seulement 2 médicaments sont autorisés en France : l'Orlistat (Xenical®) et le Liraglutide (Saxenda®). L'Orlistat limite l'absorption intestinale des lipides par inhibition des lipases gastriques et pancréatiques

bloquant ainsi l'hydrolyse des triglycérides et l'absorption des acides gras effectuée par l'endothélium intestinal. Ce mécanisme entraine une diminution d'environ 30% de l'absorption des triglycérides intestinaux. Ainsi il réduit l'absorption des calories sans affecter l'appétit. Son effet est toutefois modeste conduisant généralement à une perte de poids en moyenne de 3 kg [49,50]. Pendant longtemps, le Liraglutide, agoniste du récepteur du GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) était utilisé pour le contrôle du poids dans d'autres pays que la France où il n'était autorisé que dans le traitement du diabète de type 2, avec en effet un bénéfice constaté sur la perte de poids chez les patients. Depuis le 4 mars 2021, il est autorisé en France comme traitement de l'obésité. Le GLP-1 est un régulateur physiologique de l'appétit et de la prise alimentaire. Le Liraglutide se lie au récepteur du GLP-1 et l'active entrainant la sécrétion et la biosynthèse gluco-dépendante d'insuline, l'inhibition de la sécrétion de glucagon, le ralentissement de la vidange gastrique et une augmentation de la sensation de satiété. L'administration du traitement se fait par injection quotidienne en sous-cutané avec une dose initiale de 0,6mg qui augmente progressivement toutes les semaines allant jusqu'à une dose cible de 3mg. Il entraine une perte de poids d'environ 5 à 10% [51,52]. Cependant une reprise du poids est observée lors de l'arrêt de sa prise.

3.1.3. La chirurgie bariatrique

Les approches précédemment décrites ont un impact limité sur la perte de poids avec un taux d'échec élevé [53]. Une méthode alternative plus invasive a vu le jour dans les années 1980, celle de la chirurgie bariatrique ou également appelée « chirurgie de l'obésité ». Aujourd'hui, la chirurgie bariatrique est l'intervention la plus efficace à long terme pour réduire le poids corporel et les comorbidités associées à l'obésité chez les patients. Elle est devenue très répandue.

En général, elle est indiquée pour les patients présentant un IMC $\geq$ 40 ou IMC $\geq$ 35 avec comorbidités, après échec d'un traitement médical bien conduit pendant 6 mois ou 1 an. Cependant un élargissement des critères d'inclusion de la chirurgie bariatrique est possible en raison des bénéfices métaboliques observés. Dans certains cas elle peut être envisagée pour des personnes ayant un IMC > 35 kg/m^2, indépendamment de comorbidités et un IMC >30 kg/m^2 pour les patients atteints de diabète de type 2 et d'un syndrome métabolique dont le contrôle est insuffisant. La chirurgie bariatrique est contre-indiquée dans le cas de : troubles mentaux et cognitifs sévères, dépendance non contrôlée à la drogue ou à l'alcool, maladies

mettant en jeu le pronostic vital à court et moyen terme, troubles sévères et non stabilisés du comportement alimentaire. Par ailleurs, une évaluation préopératoire de plusieurs mois est obligatoire avant toute chirurgie bariatrique. Elle comporte : un bilan médical complet (recherche et prise en charge des comorbidités, bilan nutritionnel et vitaminique), une évaluation du comportement alimentaire, une évaluation psychologique/psychiatrique ainsi qu'une éducation thérapeutique (diététique et activité physique) [54–56].

Il existe 2 approches pour restreindre l'absorption des nutriments afin de réduire l'apport calorique journalier :

- soit par restriction gastrique (réduction de la capacité de l'estomac),
- soit par malabsorption intestinale (une partie de l'intestin est court-circuitée et les aliments vont directement dans la partie moyenne de l'intestin grêle où seule une fraction des aliments est assimilée) associée à une restriction gastrique (chirurgie mixte)

Les chirurgies de réduction gastrique pure correspondent généralement soit à la mise en place d'un anneau gastrique soit à la *sleeve* gastrectomie (Figure 7). L'anneau gastrique est posé autours de la jonction entre l'œsophage et l'estomac, afin de réduire la taille de la poche gastrique limitant ainsi l'apport alimentaire et la compliance de l'estomac. Cette technique, souvent associée à un taux élevé de réintervention, est de moins en moins pratiquée. La *sleeve* gastrectomie, quant à elle, consiste à réséquer par section verticale environ les 2/3 de l'estomac (dont la partie contenant les cellules qui secrètent la ghréline ; hormone stimulant l'appétit) créant ainsi un estomac tubulaire dont la contenance est limitée [54,57].

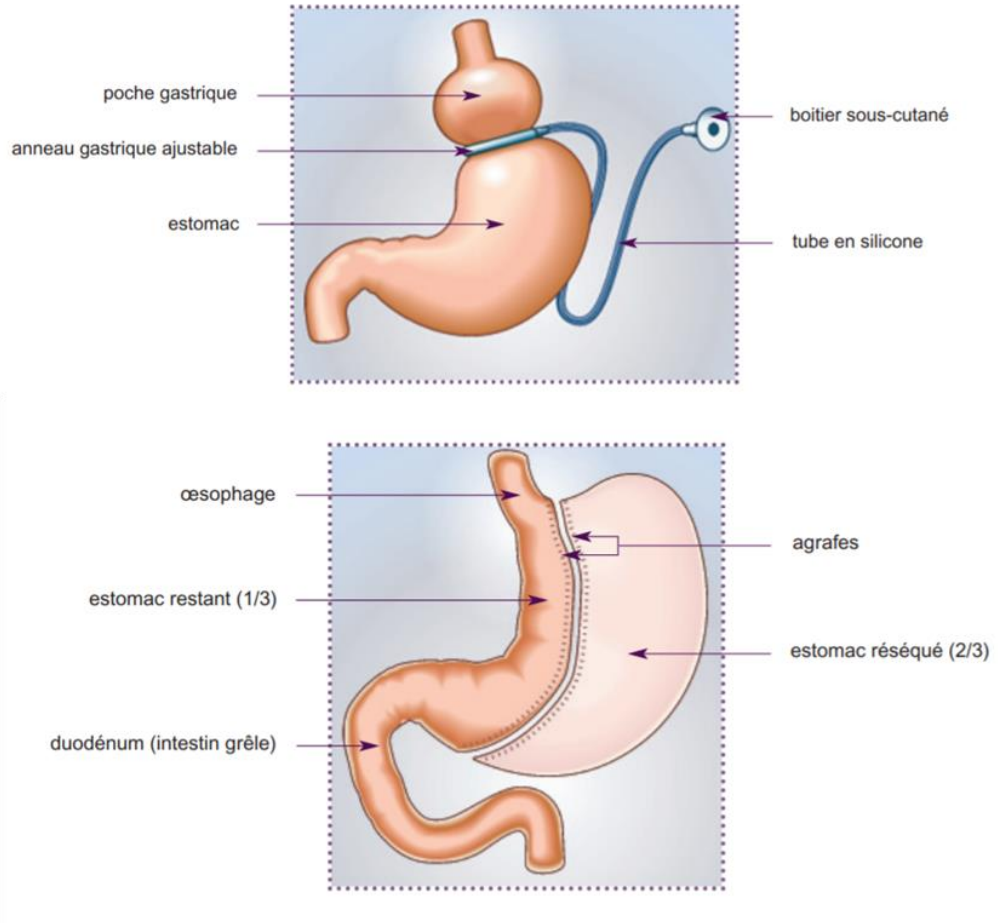


Figure 7 : Principales techniques restrictives : l'anneau gastrique (schéma du haut) et la sleeve gastrectomie (schéma du bas) [56]

Enfin la chirurgie mixte correspond à la technique du bypass de Roux-en-Y (ou court-circuit gastrique) (Figure 8). Le bypass gastrique consiste en la création d'une petite poche gastrique proximale par agrafage au niveau de la partie supérieure de l'estomac réduisant l'estomac d'environ 90%, puis un court-circuit est réalisé en raccordant cette poche gastrique à une portion de l'intestin grêle située environ un mètre en aval pour diminuer la surface d'absorption des aliments. Le raccordement se fait par l'intermédiaire d'une anastomose gastro-jéjunale sur une anse « en Y ». L'anse alimentaire (anastomosée à la poche gastrique), conduit les aliments ingérés vers l'anse commune correspondant au segment d'intestin où l'anse alimentaire rejoint l'anse biliopancréatique qui elle transporte uniquement les sécrétions biliaires, gastriques et pancréatiques. L'absorption des nutriments a ainsi lieu au niveau de l'anse commune où les nutriments rencontrent les sécrétions biliopancréatiques. Cette technique entraine de nombreuses carences et les patients doivent être supplémentés à vie (carences multi vitaminiques dont de vitamine D, de fer, de minéraux, de calcium…) [54,57,58].

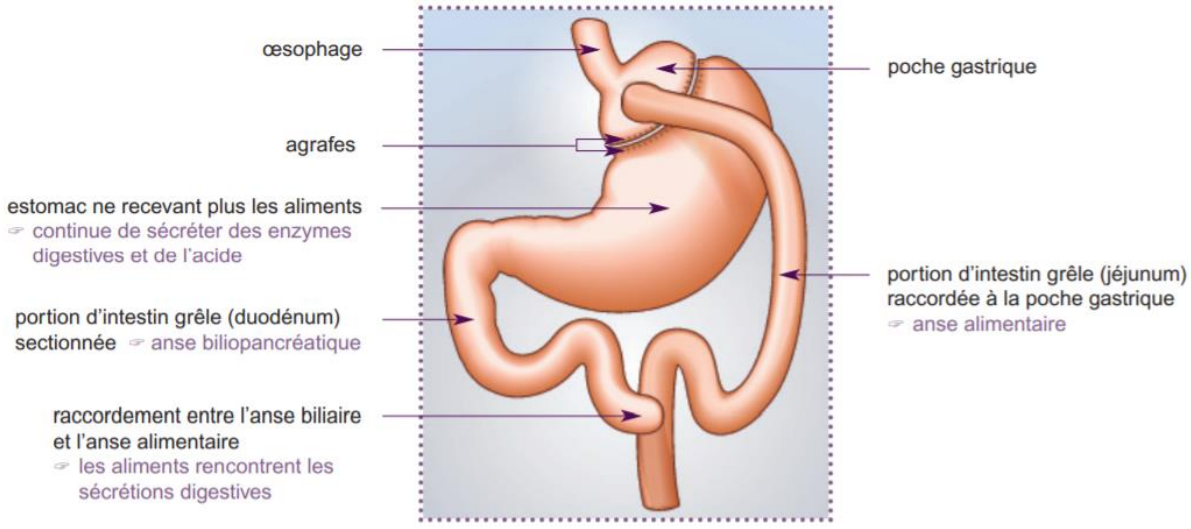


Figure 8 : Technique mixte : bypass gastrique [56].

La chirurgie bariatrique entraine de manière fiable une perte de poids rapide, marquée et durable chez les patients obèses [59]. Elle améliore aussi de façon significative les comorbidités associées à l'obésité : notamment le diabète, les maladies cardiovasculaires dont l'hypertension, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies coronariennes et l'insuffisance cardiaque [60–63]. La Figure 9 résume les effets issus des principales études à long terme qui illustrent la variabilité des résultats en fonction du type d'intervention chirurgicale pratiquée. Les interventions restrictives ont généralement un effet plus faible que les techniques mixtes sur la perte de poids, l'hypertension, la dyslipidémie et le diabète de type 2. En moyenne, on observe avec la chirurgie bariatrique une perte de poids durable pouvant aller jusqu'à 40 %, ce qui entraîne des bénéfices importants sur l'hypertension, la dyslipidémie et le diabète de type 2 chez la plupart des patients [64]. De plus, il a été observé sur le long terme que la chirurgie bariatrique était associée à un meilleur taux de survie des patients par rapport à une prise en charge non chirurgicale [57].

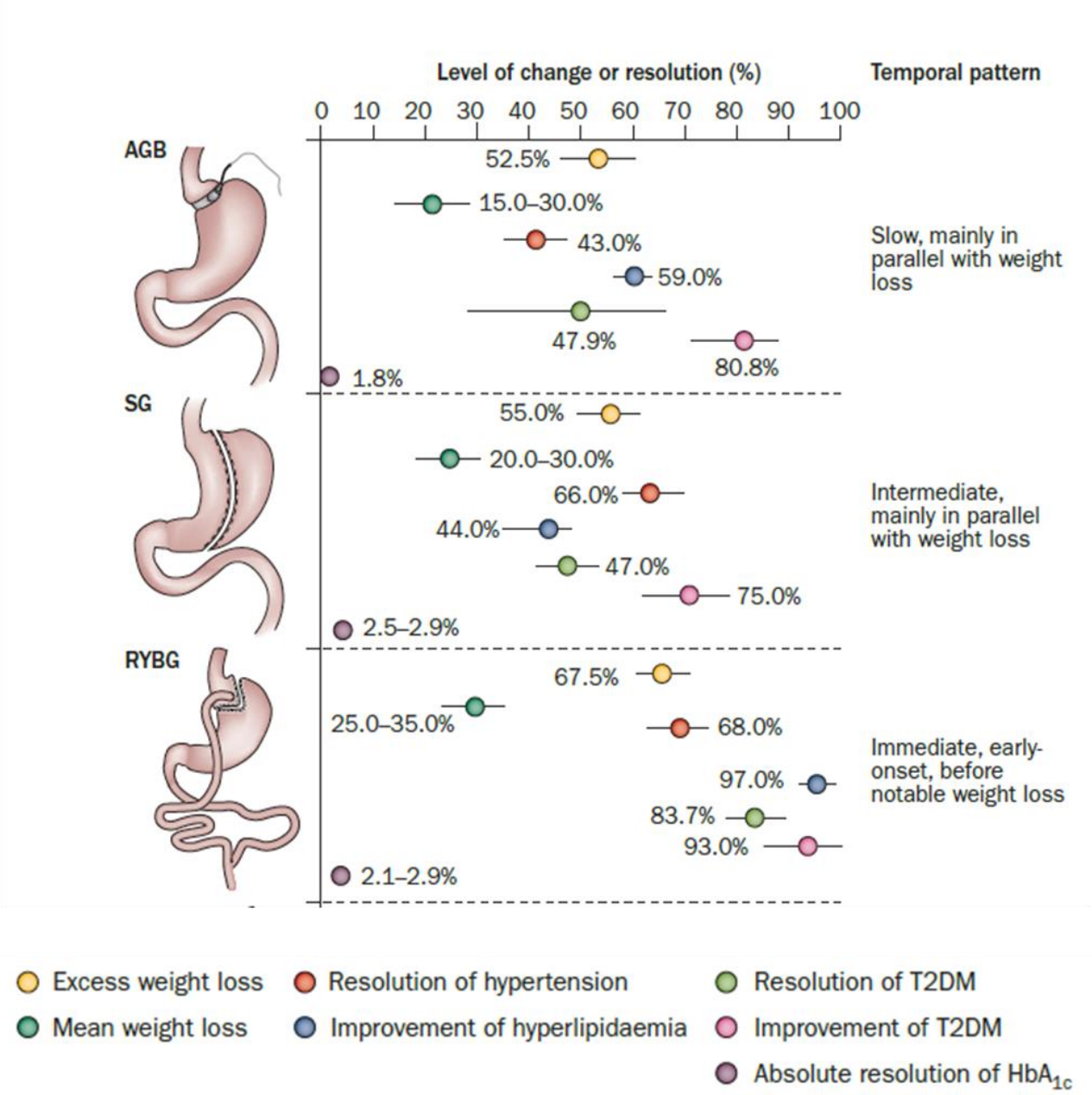


Figure 9 : Effets sur la perte de poids et l'amélioration des comorbidités des trois principaux types de chirurgie bariatrique [64]

La prévention est indispensable pour réduire la prévalence de l'obésité. Cependant, les stratégies de prévention visant à motiver la mise en place d'un régime alimentaire sain associées à une augmentation de l'activité physique au sein de la société, ou bien la mise en place de réglementations (par exemple une taxe sur les boissons sucrées, ou l'interdiction de la publicité sur les aliments hypercaloriques destinées aux enfants) se heurtent à notre mode de vie défavorable et à la pression des industries alimentaires [11]. Aujourd'hui, il existe différentes approches de prise en charge de l'obésité. Les régimes ainsi que les traitements

médicamenteux présentent des effets minimes et un taux de récidive important à court terme. La chirurgie bariatrique représente la thérapeutique la plus efficace sur le long terme avec une amélioration des comorbidités. Cependant elle est restreinte à certaines indications et reste une prise en charge lourde. L'augmentation croissante de cette pandémie, à amener à rechercher de nouvelles étiologies, de nouveaux facteurs de risque afin de pouvoir proposer dans le futur de nouvelles alternatives thérapeutiques. En effet, il a été observé que la chirurgie bariatrique entrainait une modification du microbiote intestinal et de son fonctionnement du fait des modifications anatomiques [65,66]. De plus, le développement du séquençage de l'ADN à haut débit a permis d'étudier et d'analyser les maladies métaboliques sous de nouvelles approches. De nombreux travaux ont suggéré ainsi l'implication du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité.

3.2. Microbiote intestinal : nouveau paradigme de l'obésité

Le microbiote intestinal est connu pour jouer un rôle majeur dans l'homéostasie et le métabolisme de l'hôte. Près de 10% de tous les métabolites circulants chez l'adulte sont dérivés du microbiote et participent aux voies métaboliques [67,68]. Il régule de nombreux processus physiologiques par le biais d'interactions avec l'hôte, comme la digestion des aliments, l'absorption et le métabolisme des nutriments, la synthèse des vitamines et des acides biliaires, ainsi que dans le maintien de l'intégrité et de la fonction de la barrière intestinale. Il assure également une défense naturelle contre les espèces pathogènes par la compétition et le maintien de la muqueuse [68,69]. Un déséquilibre de la composition du microbiote (également appelé dysbiose) a des conséquences fonctionnelles et peut être impliqué dans le développement ou l'aggravation de certaines pathologies.

La causalité du microbiote intestinal dysbiotique dans l'obésité a été mise en évidence dans de nombreuses études sur le modèle animal (souris) par transfert de microbiote. Sous régime gras, des souris axéniques (dépourvues de bactéries et vivant en isolateur) colonisées avec un microbiote intestinal issu de souris obèses prennent plus de poids que celles avec un microbiote de souris normo-pondérées [70]. D'autre part, le transfert d'un microbiote dysbiotique de patients obèses dans des souris axéniques aggrave l'obésité des souris [71]. Dans le cas de l'obésité, autant chez la souris que chez l'humain, la dysbiose du microbiote intestinale est caractérisée par une réduction de la diversité de la communauté bactérienne associée à une augmentation du pourcentage du phylum de *Firmicute* et une diminution du

phylum *Bactéroïdes* [72]. Les habitudes alimentaires comme une alimentation riche en graisses peuvent contribuer aux variations du microbiote intestinal. Une augmentation du rapport bactéries Gram-négatives/bactéries Gram-positives dans les selles a été rapportée chez des souris nourries avec un régime gras [73]. L'obésité est caractérisée par une inflammation chronique de bas grade et il a été montré que le microbiote intestinal pouvait contribuer à cette inflammation systémique. La dysbiose intestinale est associée à l'altération de la perméabilité de la barrière intestinale par des mécanismes qui modifient l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les jonctions-serrées des cellules épithéliales (les occludines par exemple) [73]. Cette perméabilité accrue favorise la translocation de bactéries entières ou de métafacteurs bactériens comme les LPS dans la circulation sanguine et vers les tissus métaboliques [74,75]. Des concentrations plus élevées de LPS au niveau systémique ont été retrouvées chez des souris obèses et provoquent un état d'endotoxémie métabolique [75]. La translocation bactérienne vers les différents tissus périphériques comme le tissu adipeux déclenche une réaction immuno-inflammatoire via l'activation de récepteurs TLR-4 conduisant à la prolifération de pré-adipocytes et de macrophages et à l'augmentation de l'inflammation [40].

Enfin, d'autres mécanismes par lesquels le microbiote intestinal pouvait contribuer à l'obésité par augmentation du stockage énergétique ont également été proposés [68,69,76,77] :

- En augmentant les acides gras à chaînes courtes, la flore fournit plus de nutriments lipogéniques à l'organisme et augmente ainsi la lipogénèse hépatique et le stockage adipocytaire.
- En inhibant l'expression de la protéine FIAF (Fasting Induced Adipose Factor) dans l'intestin, les bactéries augmentent indirectement l'activité de l'enzyme lipoprotéine lipase (LPL). Cette dernière catalyse la libération des acides gras à partir des triglycérides associés aux lipoprotéines circulantes, permettant ainsi aux acides gras d'être captés par le muscle ou le tissu adipeux.

A partir de ces découvertes, de nouvelles thérapeutiques centrées autour du microbiote intestinal ont été proposées pour prendre en charge l'obésité. Une première approche nutritionnelle consiste à administrer en prévention ou en accompagnement thérapeutique, des prébiotiques, des probiotiques ou les deux [68,69].

- Les prébiotiques sont définis comme des substrats qui sont utilisés sélectivement par les bactéries de l'hôte, entraînant des modifications à la fois de la composition

de la flore intestinale mais aussi de son activité, ce qui se répercute de façon bénéfique sur le bien-être et la santé de l'individu. Ce sont des extraits de fibres alimentaires, comprenant les amidons non digestibles, tels que l'inuline ou l'oligofructose. Ils ne sont pas absorbés par l'hôte mais sont digérés et fermentés par certaines bactéries constitutives du microbiote intestinal. Les produits de cette fermentation qui sont, par exemple, les acides gras à chaîne courte (acétate, propionate, butyrate et leurs dérivés) vont interagir avec les cellules intestinales, notamment les cellules épithéliales, immunitaires et nerveuses. Ils vont induire par exemple la sécrétion de défensines, des peptides naturels ayant un rôle antimicrobien mais aussi la sécrétion de GLP-1 ou de PYY (peptide YY) tous deux impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique et de la satiété [78,79].

- Les probiotiques sont constitués de bactéries vivantes commensales administrées oralement en quantité suffisante afin de coloniser le colon. Leur objectif n'est pas de changer complètement la composition microbienne mais plutôt d'interagir directement avec les cellules de l'hôte et de contribuer ainsi à renforcer ses défenses et à moduler les fonctions des cellules intestinales. Il a été montré que la supplémentation en *Bifidobacterium* peut avoir des effets métaboliques bénéfiques chez les rongeurs nourris par un régime gras, principalement en améliorant l'intégrité de la barrière intestinale, réduisant ainsi la translocation des LPS bactériens, l'endotoxémie et l'inflammation [80,81].

Les prébiotiques et probiotiques peuvent aider à retarder ou à prévenir les comorbidités associées à l'obésité. En revanche, il n'existe pas de données concluantes chez l'Homme pour soutenir que l'apport en prébiotiques et probiotiques puisse contribuer à une diminution du poids corporel [82].

La deuxième approche correspond à la transplantation de microbiote fécal qui consiste en l'introduction d'un microbiote fécal d'un individu normo-pondéré dans l'intestin d'un individu obèse afin de remédier aux dysbioses consécutives à la pathologie. Le principal avantage de la transplantation de microbiote fécal par rapport aux probiotiques est sa capacité à transférer l'intégralité du microbiote intestinal et des métabolites du donneur au receveur, avec une capacité supérieure d'amélioration de la dysbiose intestinale par rapport aux cibles microbiennes uniques des probiotiques. Cette thérapie a prouvé son efficacité dans le

traitement des infections entériques récurrentes et réfractaires à *Clostridium difficile* [83]. Bien que de nombreuses études chez les rongeurs aient démontré que la transplantation de microbiote fécal pouvait contribuer à réduire l'obésité, il n'existe aucune preuve chez l'Homme. *Vrieze et* al. ont constaté que la transplantation de microbiote fécal de donneurs maigres à des patients atteints du syndrome métabolique augmentait la sensibilité à l'insuline 6 semaines après la perfusion, sans changement concomitant au niveau du poids corporel et des mesures d'adiposité [84]. Une augmentation de la diversité bactérienne a également été observée suite à la transplantation dans le microbiote du receveur [85].

En résumé, les mécanismes exacts par lesquels un "microbiote obèse" influence le développement de l'obésité ne sont pas totalement élucidés. Cependant, des interventions nutritionnelles ou thérapeutiques visant à prévenir ou à corriger leur dysbiose constituent de nouvelles approches thérapeutiques pour les complications de l'obésité mais nécessitent encore des études supplémentaires chez l'Homme.

Le microbiote intestinal est l'écosystème microbien le plus important de notre organisme. Nous avons pu voir qu'il pouvait jouer un rôle dans l'émergence et la régulation de pathologies systémiques telles que l'obésité. Il existe un autre écosystème microbien majeur : le microbiote oral. Historiquement, la cavité buccale a été l'un des premiers sites utilisés pour la découverte des micro-organismes humains par Van Leeuwenhoek il y a plus de trois siècles [86]. Nous savons maintenant que notre bouche, à travers son microbiote, communique intensément avec l'ensemble de notre organisme [87,88]. En effet, une dysbiose orale provoque un état inflammatoire localisé qui peut contribuer au maintien d'une inflammation systémique chronique de bas grade [89]. Cela peut conduire au développement ou à l'aggravation de pathologies systémiques, parfois avec un degré de morbidité important. L'identification des bactéries responsables de ces relations entre la cavité buccale et le reste du corps est donc d'un intérêt majeur. Le microbiote oral devient ainsi un marqueur de notre santé générale via son activité systémique.

II- LE MICROBIOTE ORAL

1. GENERALITES

1.1. Caractéristiques et composition

La cavité buccale abrite un écosystème microbien riche et complexe, le microbiote oral. Le microbiote oral est le deuxième réservoir le plus important de notre organisme après le microbiote intestinal. Depuis plusieurs années il fait l'objet de nombreuses études [90]. Il est composé de microorganismes commensaux, symbiotiques et pathogènes comprenant principalement des bactéries, mais aussi des virus, des protozoaires, des champignons, des archées, des phages et des bactéries ultras petites appartenant au groupe de radiation du phyla candidat (Candidate phyla radiation group) [87,91,92]. Présents à l'état physiologique, ces micro-organismes cohabitent avec le corps humain dans un état de symbiose. Il existe deux équilibres : l'un entre la prolifération des différentes espèces et les capacités immunitaires de l'hôte et l'autre entre les espèces microbiennes elles-mêmes. Cet équilibre au sein du microbiote est appelé eubiose et sa rupture, appelée dysbiose, est associée aux pathologies buccales et systémiques. L'accessibilité du site fait de ce microbiote l'une des communautés bactériennes les mieux connues du corps humain, avec plus de 500 espèces différentes identifiées chez les adultes.

Différentes niches écologiques du microbiote :

La cavité buccale est un écosystème complexe qui présente de multiples niches et habitats microbiens distincts. Les différentes niches écologiques qui composent le microbiote oral sont situées au niveau des surfaces dures des dents et des surfaces épithéliales des muqueuses. Les principales niches sont l'épithélium buccal, la langue, les surfaces dentaires supra-gingivales et l'espace sous-gingival [93,94]. Les caractéristiques de chaque habitat (potentiel d'oxydo-réduction, quantité d'oxygène, pH…) conditionnent la composition quantitative et qualitative de la flore. Par exemple, l'espace sous-gingival est un habitat faible en oxygène avec un faible potentiel redox et présente une quantité plus importante de bactéries anaérobies Gram-négatives [95].

Acquisition du microbiote oral :

Même si le microbiote maternel joue déjà un rôle important dans le développement neurologique du fœtus avant la naissance [96,97], l'environnement de l'enfant est essentiel à la construction de son microbiote qui n'est pas uniquement acquis par l'hérédité [98–101]. L'acquisition du microbiote oral commence dès les premières minutes de vie par le contact direct avec le microbiote maternel (peau, vagin et bouche) [102] (Figure 10). Au moment de la naissance, la cavité orale est stérile mais la transmission verticale de la mère à l'enfant commence immédiatement après. Selon le mode de naissance (par voie vaginale ou par césarienne), les premiers colonisateurs affectant le microbiote oral de l'enfant sont différents [103]. Dans la cavité buccale des nouveau-nés, seules les muqueuses peuvent être colonisées ce qui limite le nombre de sites et donc d'espèces. L'éruption des dents lactéales et permanentes crée un bouleversement écologique avec la création de nouveaux habitats (surface dures et sillons gingivo-dentaires) et est un phénomène crucial dans le développement du microbiote oral. La dent représente une nouvelle surface de colonisation pour la plaque supra et sous-gingivale, conduisant ainsi à une augmentation de la diversité microbienne [104]. Enfin au cours de l'adolescence, les modifications hormonales retrouvées au niveau du fluide gingival peuvent également modifier la flore [105–107].

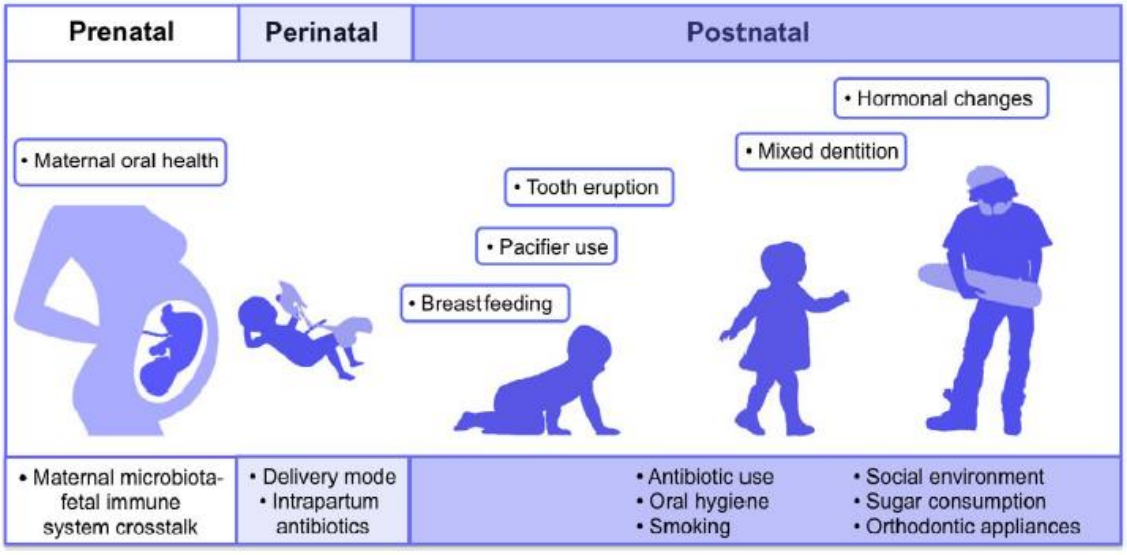


Figure 10 : Facteurs impliqués dans l'acquisition du microbiote oral du fœtus à l'enfance et l'adolescence [97]

Une fois installé, le microbiote oral évolue tout au long de la vie et varie fortement d'un individu à l'autre suivant différents facteurs endogènes et exogènes [108]. En effet, l'abondance, la diversité et la composition du microbiote oral sont liées à l'alimentation, la grossesse, l'hygiène bucco-dentaire, l'état de santé, la génétique et le mode de vie (tabagisme, alcool par exemple) (Figure 11).

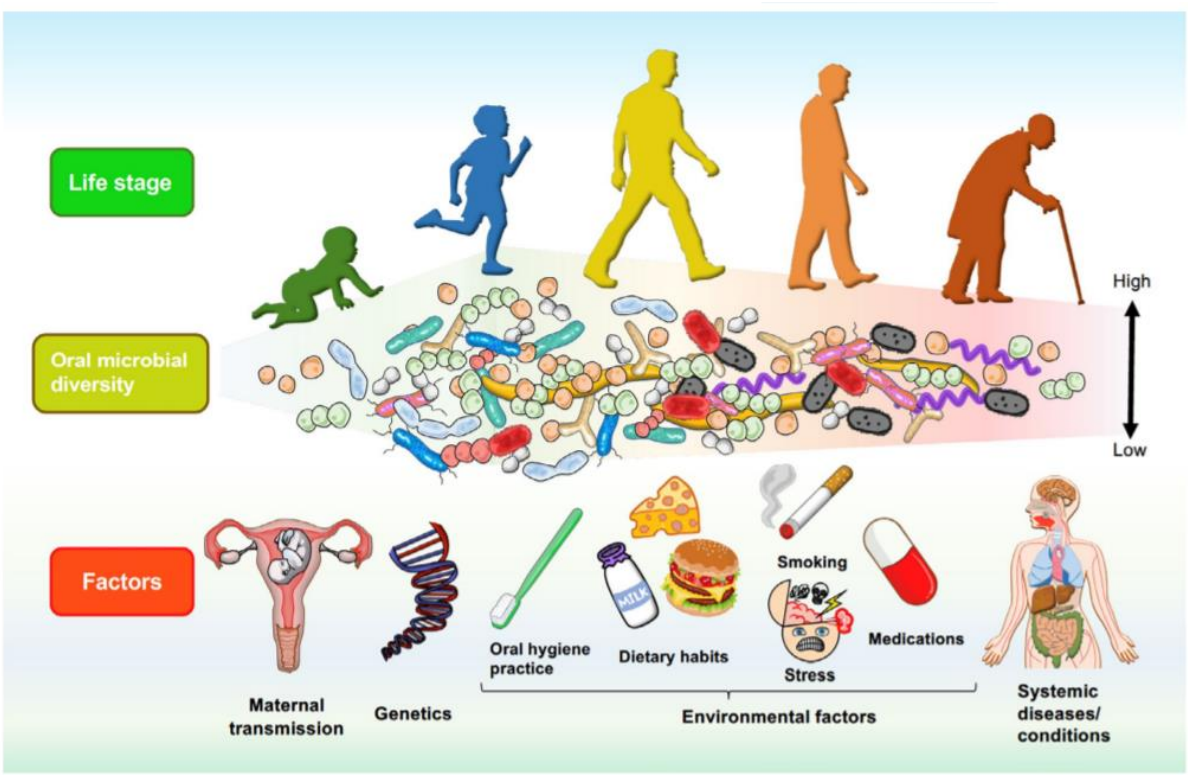


Figure 11 : Modification du microbiote au cours de la vie [109]

1.2. La salive : élément indispensable au maintien de l'homéostasie

La salive a une influence majeure sur le microbiote oral et participe au maintien de l'homéostasie buccale [110] (Figure 12). La salive totale (ou fluide oral) est un mélange complexe de sécrétions produites par les glandes salivaires principales (parotides, submandibulaire et sublinguales) et accessoires, de débris alimentaires, de bactéries orales non adhérentes, de cellules épithéliales buccales desquamées, de fluide gingival et de composés dérivés du sang (protéines plasmatiques, érythrocytes et leucocytes). Elle est composée de 99% d'eau et de 1% de constituants organiques (protéines extrinsèques et intrinsèques, urée, facteurs de croissances…) et inorganiques (ions sodium, potassium, calcium, bicarbonate...) [111,112].

La salive, par ses composants et ses propriétés, exerce une grande variété de fonctions qui contribuent à promouvoir la santé orale [110,111] :

- Protection et lubrification des muqueuses : un flux normal de salive assure une lubrification continue des dents et des muqueuses via la pellicule exogène acquise (PEA) ; les protégeant des traumatismes provoqués par la mastication, la déglutition et la phonation. Cette lubrification limite également la déshydratation des muqueuses induite par la respiration et facilite également l'élocution.

- Pouvoir tampon : le pouvoir tampon de la salive est assuré par la présence de bicarbonate, de phosphate, d'urée et de certaines protéines. Il permet de maintenir un pH physiologique malgré les nombreuses variations liées à la prise alimentaire mais aussi à l'acidité produite par les bactéries. Le maintien d'un pH neutre au sein de la cavité buccale est important pour la stabilité d'une composition microbienne saine et par conséquent pour la symbiose.

- Rôle dans la gustation, déglutition, et digestion du bol alimentaire : grâce aux substances mucilagineuses qu'elle contient (mucines), la salive facilite la formation du bol alimentaire et la déglutition. Des enzymes telles que l'α-amylase et la lipase, présentes dans la salive, participent aux premières étapes de la digestion des sucres et des graisses (comme par exemple la dégradation de l'amidon et l'hydrolyse de triglycérides). La salive permet aussi la dissolution des arômes favorisant leur répartition dans la cavité orale et leur fixation aux sites récepteurs du goût.

- Action mécanique nettoyante : le flux salivaire assure un nettoyage mécanique des surfaces muqueuses et dentaires éliminant en partie la flore microbienne. La déglutition est facilitée par la propriété visqueuse de la salive. Ainsi par la déglutition, la salive joue un rôle important dans l'élimination d'un grand nombre de bactéries non adhérentes (effet de chasse salivaire par la déglutition).

- Propriétés antimicrobiennes : grâce à ses différents composants immunitaires non spécifiques (lysozyme, lactoferrine, lactoperoxydase, mucines, histatines…) [110,113]. Ces molécules ont des effets antimicrobiens directs (antibactériennes,

antifongiques, antivirales) ou indirects. Le lysozyme détruit la paroi de certaines bactéries par son activité muramidase. La lactoferrine, une fois clivée, libère la lactoferricine qui a une activité bactéricide en formant des pores dans la membrane bactérienne (par exemple en inhibant l'adhésion et la colonisation de certains micro-organismes) [111]. La salive contient également des Immunoglobuline A (IgA), Immunoglobuline G (IgG) et Immunoglobuline M (IgM). Les IgA sont les plus représentées dans la cavité orale. Elles sont produites en réponse à une stimulation antigénique périphérique et sont les effecteurs de l'exclusion immune spécifique.

La salive est un élément clé du maintien d'un microbiote oral équilibré. Du fait des différentes propriétés précédemment énumérées, un flux salivaire insuffisant peut facilement conduire à une dysbiose.

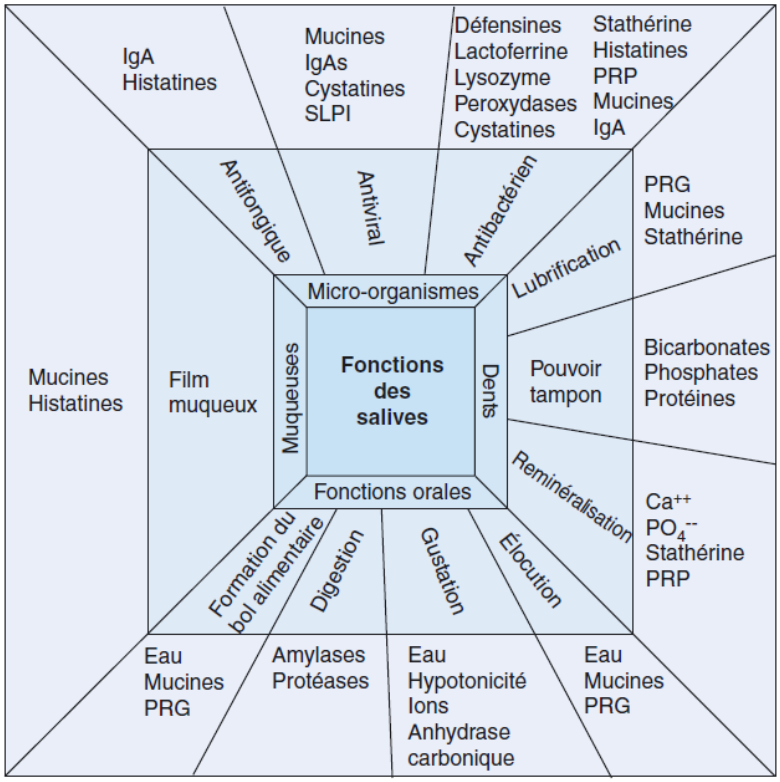


Figure 12 : Représentation des différentes fonctions de la salive et des différents intervenants [114]
(IgA = Immunoglobulines A, IgAs = Immunoglobulines A sécrétoires, PRP = Proline-Rich Proteins, PRG = PRP glycosylées, SLPI = Secretory Leukocyte Protease Inhibitor)

1.3. Méthodes d'investigation du microbiote oral

Les analyses du microbiote oral se font principalement sur le microbiote salivaire et le microbiote sous-gingival (également appelé parodontal). Pour le prélèvement du microbiote salivaire, de la salive non stimulée est extraite et recueillie dans des tubes stériles. Le prélèvement sous-gingival est réalisé à l'aide de pointes papiers stériles insérées dans le sulcus pendant 30 secondes à l'abri de la salive (avec une éviction préalable de la plaque supra-gingivale).

1.3.1. Moyens d'exploration du microbiote oral

Les différentes techniques pour analyser le microbiote ont largement évolué au cours des 30 dernières années.

La culture :

Initialement le microbiote était analysé par la culture, technique non spécifique permettant de mettre en évidence et d'identifier tous types de pathogènes (bactérien mais aussi fongiques) selon le milieu de culture et les conditions (aérobiose/anaérobiose) choisies. Cependant, la principale limite de cette méthode résidait dans le fait qu'elle ne permettait pas de fournir une vision de l'ensemble des micro-organismes, puisqu'un grand nombre de bactéries n'était pas cultivable. On estime que seulement 10% des microorganismes peuvent être isolés avec la culture bactérienne [95].

La PCR (Polymerase Chain Reaction) d'identification quantitative

La PCR quantitative est une technique utilisée pour identifier et quantifier des microorganismes spécifiques par amplification de séquences d'ADNr 16S spécifiques d'espèces procaryotes (bactéries par exemple) ou ADNr 18S pour les eucaryotes (champignons et protozoaires par exemple) en utilisant des amorces complémentaires fluoromarquées. Cette technique est rapide, sensible et standardisée. Cependant, elle ne permet d'identifier et de quantifier dans l'échantillon qu'un groupe d'espèces déjà connues. Il n'est pas possible avec cette technique d'identifier de nouvelles espèces bactériennes par exemple.

Le séquençage métagénomique

Les progrès des nouvelles technologies de séquençage (NTS, à haut débit) de l'ADN permettent de générer plus facilement une grande quantité de données décrivant la composition et la dynamique des communautés microbiennes. Il existe 2 approches métagénomiques : la métagénomique ciblée et la métagénomique globale (également appelée métagénomique « shotgun ») (Figure 13). La métagénomique ciblée consiste à l'amplification puis au séquençage d'une région particulière du génome. Une région fréquemment utilisée est l'ADNr 16S des bactéries mais cela peut être aussi la région de l'espaceur interne transcrit (ITS) ou l'ADNr 18S pour les champignons et protozoaires. La métagénomique informe uniquement sur la composition taxonomique de l'échantillon. À l'inverse, la métagénomique globale consiste en un séquençage de tout l'ADN contenu dans l'échantillon sans *a priori*. Elle permet de mettre en évidence le contenu en gènes d'une population microbienne et nous renseigne également sur le potentiel fonctionnel de ces communautés [115–118].
Nous avons utilisé dans nos travaux, la métagénomique ciblée 16S. La majorité des études sur le microbiote oral se concentre sur les espèces procaryotes car elles sont les plus abondantes.

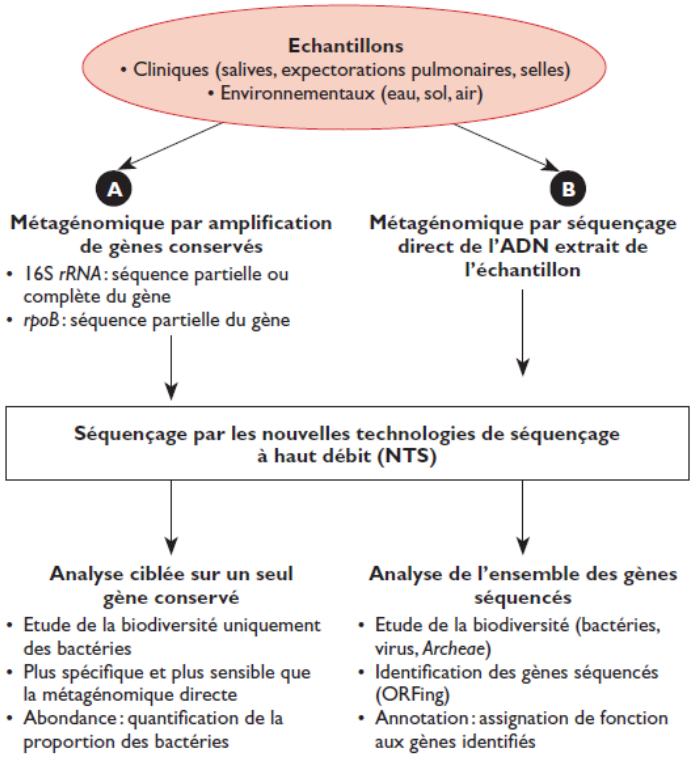


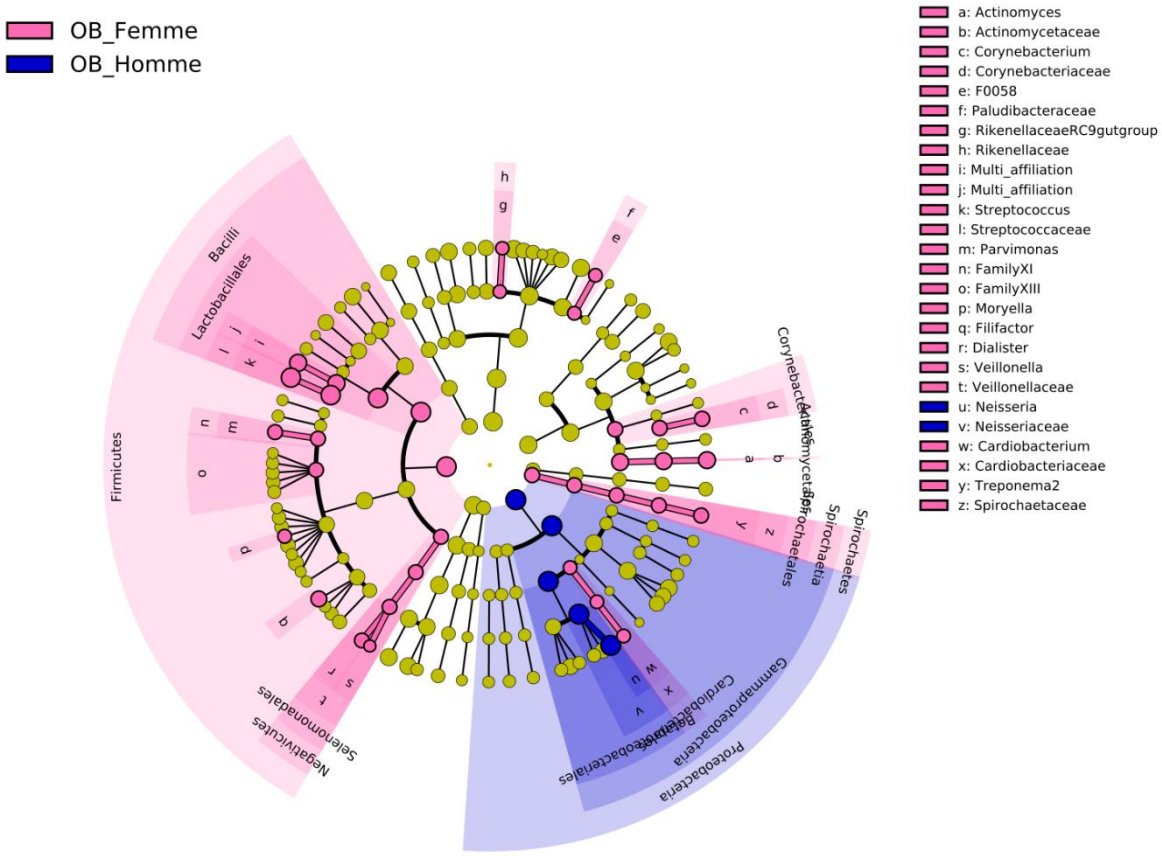
Figure 13 : Les différentes étapes et application de la métagénomique par amplification de gènes conservés (=métagénomique ciblée) et de la métagénomique par séquencage de direct de l'ADN (=métagénomique globale) [119]

Enfin il existe d'autres techniques telles que la métatranscriptomique et la métaprotéomique qui permettent de déterminer les ARNm ou les protéines exprimées par le microbiote pour une meilleure connaissance des fonctions de ces communautés.

1.3.2. Analyse statistique comparative des microbiotes

Le LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) est une méthode qui permet de comparer la composition du microbiote de 2 groupes à différents niveaux taxonomiques (famille, genre, espèces), en utilisant les abondances relatives. Cette méthode calcule d'abord la *p-value* de la somme des rangs de Kruskal-Wallis pour détecter les caractéristiques significatives différentiellement abondantes entre les groupes, puis effectue une analyse discriminante linéaire pour déterminer la taille de l'effet de ces attributs spécifiques [116,120].

Il existe 2 façons possibles de représenter les résultats d'un LEfSe. Soit avec un diagramme en barres représentant les caractéristiques différentielles et dont la longueur de chaque barre est proportionnelle à la taille de l'effet (score LDA). Soit avec un cladogramme qui illustre les différences significatives et la phylogénie (Figure 14 et 15).



<u>Figure 14 :</u> LEfSe sous forme de Cladogramme représentant les différences significatives de composition bactérienne de microbiote oral entre une groupe de femmes obèses et un groupe d'hommes obèses (Thomas et al, Diagnostics 2021)[121].

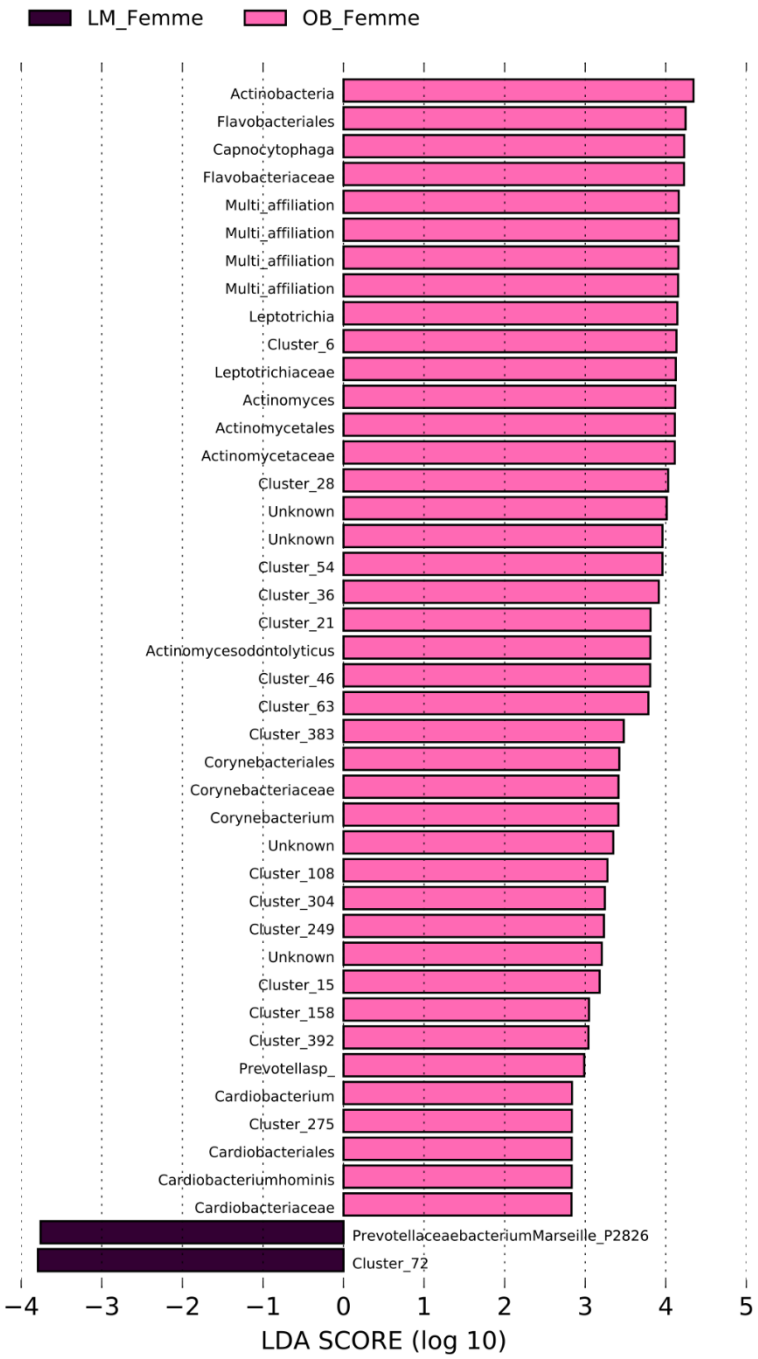


Figure 15 : LEfse sous forme de diagramme en barre (score LDA) représentant les caractéristiques différentielles de composition bactérienne de microbiote oral entre un groupe de femmes obèses (rose) et un groupe de femmes normo-pondérées (noir) (Thomas et al, Diagnostics 2021)[121]

1.3.3. Évaluation de la diversité microbienne

Les différences entre les microbiotes sont évaluées à l'aide 2 mesures de diversité : la diversité *alpha* et la diversité *bêta*.

- La diversité *alpha* est une mesure quantifiant la diversité au sein d'un échantillon unique qui dépend principalement de 2 facteurs : la richesse (nombre d'espèces) et l'abondance (régularité = uniformité de la taille de la population de chacune des espèces présentes). Par exemple dans la figure ci-dessous (Figure 16), les échantillons 1 (A) et 2 (B) ont la même richesse en espèces, soit cinq espèces chacune. Cependant, les composants de l'échantillon 1 (A) sont plus uniformément répartis que dans l'échantillon 2 (B). Il existe plusieurs indices mesurant la diversité *alpha* : l'indice Chao1 (basé sur la richesse des espèces), ainsi que les indices de Shannon et de Simpson, qui mesurent à la fois la richesse et la régularité des espèces [115,122,123].

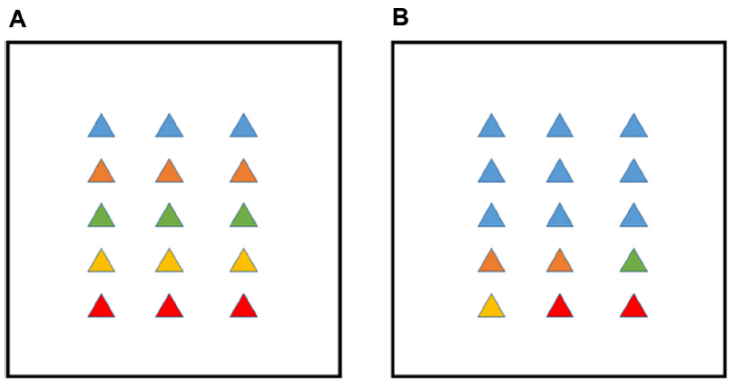


Figure 16 : Explication des notions de richesse en espèces et de régularité (les triangles représentent les espèces bactériennes, et les différentes espèces sont présentées dans des couleurs différentes)*[122]*.

- La diversité *bêta* correspond à la diversité inter-échantillon. La diversité *bêta* est souvent calculée en comparant la dissimilarité des caractéristiques, ce qui donne une matrice de distance entre toutes les paires d'échantillons. Il existe différents indices de diversité *bêta* qui permettent d'étudier la différence de compositions des communautés entre les échantillons (Bray-Curtis, Unifrac, Jaccard…). Ces indices diffèrent selon les paramètres pris en compte : la présence, l'absence et l'abondance des taxons, la distance phylogénétique [124,125]. La diversité *bêta* est souvent visualisée par des méthodes d'ordination telles que

l'analyse en coordonnées principales (ACoP) ou l'analyse en composantes principales (ACP) qui permettent d'avoir une représentation visuelle bidimensionnelle ou tridimensionnelle des distances entre les échantillons. Cependant, le regroupement visuel d'échantillons proches ou éloignés les uns des autres ne peut être interprété comme une différence statistique uniquement après évaluation statistique à l'aide d'un test PERMANOVA [126].

2. DYSBIOSE DU MICROBIOTE ORAL

2.1. Définition

La plupart du temps, un équilibre homéostatique existe entre l'hôte et les communautés microbiennes appelé eubiose. Ces bactéries cohabitent avec le corps humain dans un état de symbiose. Il existe deux équilibres : l'un entre la prolifération des différentes espèces et les capacités immunitaires de l'hôte et l'autre entre les espèces bactériennes elles-mêmes [127]. Comme nous l'avons vu précédemment, la composition du microbiote oral peut varier en fonction de plusieurs facteurs tels que l'âge, le régime alimentaire, les habitudes de vie (tabagisme par exemple) sans toutefois conduire obligatoirement à un état pathologique. La salive mais aussi des commensaux jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie. Ce phénomène fait référence à une notion de « résilience » c'est-à-dire la capacité d'un écosystème à faire face à des perturbations sans passer à un autre état dans lequel les espèces centrales et les fonctions clés sont perdues [128].

Cependant, dans certains cas une rupture de l'équilibre du microbiote s'installe appelée dysbiose. La dysbiose correspond à un déséquilibre qui peut se produire entre les bactéries d'une communauté ou entre le microbiote et l'hôte, et qui est préjudiciable à l'hôte. Le déséquilibre peut concerner la quantité et/ou l'influence d'espèces microbiennes individuelles par rapport à leur abondance ou leur influence sur la santé. Le déséquilibre peut également être causé par une réponse immunitaire mal contrôlée ou inadaptée [127,129]. La persistance de la dysbiose orale peut conduire au développement de pathologies bucco-dentaires et avoir également des répercussion au niveau systémique [88].

2.2. Le Biofilm

Les bactéries sont présentes dans la cavité buccale sous plusieurs formes : soit à l'état planctonique, comme dans la salive, soit sous forme de biofilm comme dans la plaque dentaire, soit infiltrées dans les tissus et la muqueuse orale. Les bactéries présentes sous forme planctonique circulent librement dans l'environnement buccal, alors que le biofilm représente une communauté structurée et hétérogène de microorganismes enrobée dans une matrice polymérique extracellulaire qui forme un dépôt adhérent à la surface des dents et de la muqueuse buccale [130]. Les surfaces dentaires sont recouvertes d'un film organique appelé Pellicule Exogène Acquise (PEA), qui protège les dents des agressions mécaniques et acides, mais peut également conditionner la surface de la dent pour favoriser la fixation des bactéries dans le cadre du processus de développement du biofilm. En effet, les bactéries planctoniques présentes dans la salive peuvent adhérer à la PEA de manière réversible par des forces électrostatiques et de Van Der Waals ou de manière irréversible par des liaisons ioniques ou covalentes. La première étape de la création d'un biofilm est l'adhésion irréversible de bactéries pionnières telles que *Streptococcus gordonii, Streptococcus oralis,* ou *Streptococcus mitis* à la PEA. Une fois fixées, ces bactéries pionnières prolifèrent. Ensuite, ces colonisateurs primaires permettent l'agrégation de nouvelles bactéries appelées colonisateurs tardifs ou secondaires (par exemple les genres *Fusobacterium, Haemophilus, Porphyromonas, Veillonella*…) [131]. Au fur et à mesure de l'accroissement et de la maturation du biofilm, un équilibre se crée entre la fixation de nouvelles bactéries et la multiplication de bactéries présentes d'une part, et le détachement de bactéries adhérentes d'autre part (suite à l'effet des forces de cisaillement par exemple) (Figure 17).

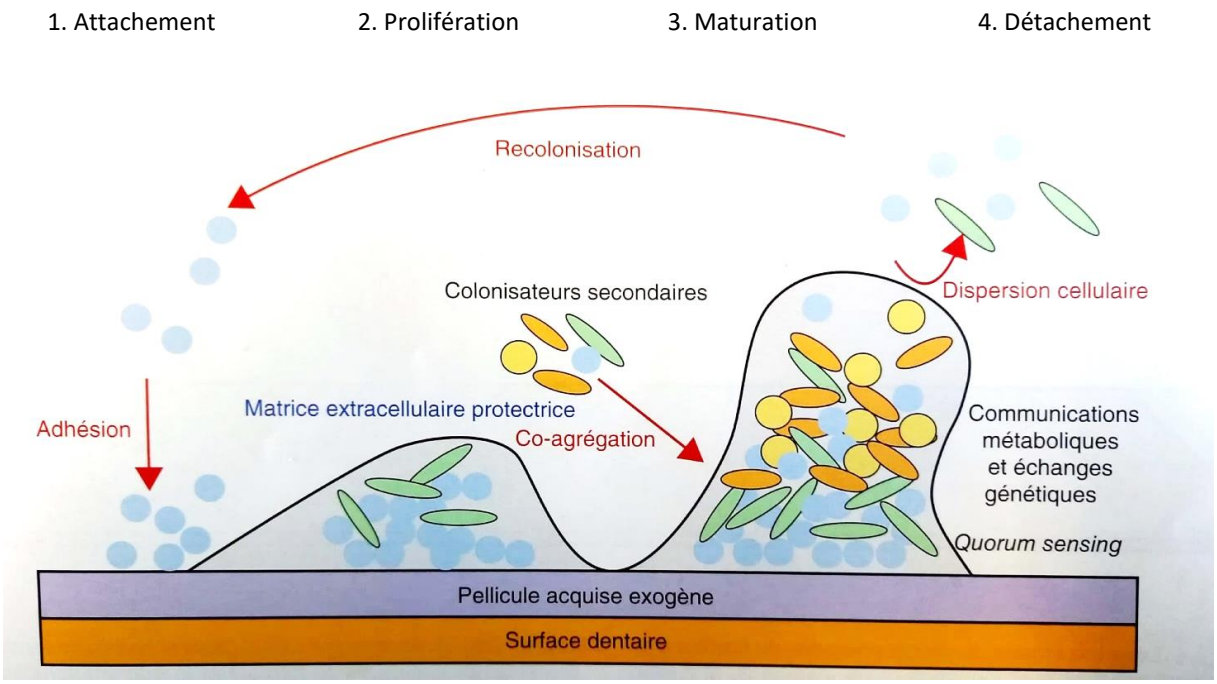


Figure 17 : Représentation schématique de la formation d'un biofilm [132]

La vie en communauté au sein du biofilm présente des spécificités ainsi que des avantages pour les bactéries. Au sein du biofilm, il existe une communication entre les différentes espèces bactériennes. Plusieurs interactions synergiques sont facilitées : physiques (co-agrégations et co-adhérences), métaboliques et physiologiques (expression géniques et signalisation intercellulaire). Par exemple, la consommation d'oxygène par les bactéries aérobies est favorable à l'installation de bactéries anaérobies et des déchets métaboliques libérés par certaines bactéries peuvent être utilisés par d'autres bactéries voisines. Les bactéries peuvent également échanger leur matériel génétique permettant par exemple le transfert de caractères de résistance. Il existe aussi une communication inter-bactérienne par des signaux chimiques via des molécules diffusibles. Cela correspond au « *quorum sensing* » qui est considéré comme un mécanisme de régulation du comportement bactérien capable d'activer un régulateur transcriptionnel qui déclenche l'expression de gênes cibles. De nombreux mécanismes sont ainsi régulés : le développement et la croissance bactérienne, la sporulation, la mise en place de facteurs de virulence jouant un rôle dans l'adaptation écologique et dans la pathogénicité. Les molécules signals responsables du *quorum sensing* appartiennent aux auto-inducers 2 (AI 2). Enfin, cette organisation en biofilm avec la matrice extracellulaire qui agit comme une barrière de protection, confère des super-

résistances vis à vis d'agents antimicrobiens par rapport aux mêmes bactéries sous forme planctonique. Par ailleurs, cette organisation spatiale particulière est responsable de résistance, par défaut de diffusion, aux antibiotiques ainsi que de mécanismes de défenses de l'hôte à l'intérieur des biofilms [95,127,132].

Une rupture de l'équilibre peut survenir au sein du biofilm bactérien suite à l'action des facteurs de dysbiose (alimentation, tabac, plaque…). La dysbiose se caractérise par un glissement progressif vers des bactéries aux profils spécifiques qui possèdent des fonctions métaboliques et un potentiel de virulence élevé. L'installation et la persistance d'une dysbiose orale peut entrainer le développement de pathologies orales.

2.3. Pathologies orales en lien avec une dysbiose orale

La dysbiose du microbiote oral est à l'origine de deux pathologies buccales majeures : la carie et la parodontite. Cependant, ces deux pathologies ont des profils différents [127] (Figure 18).

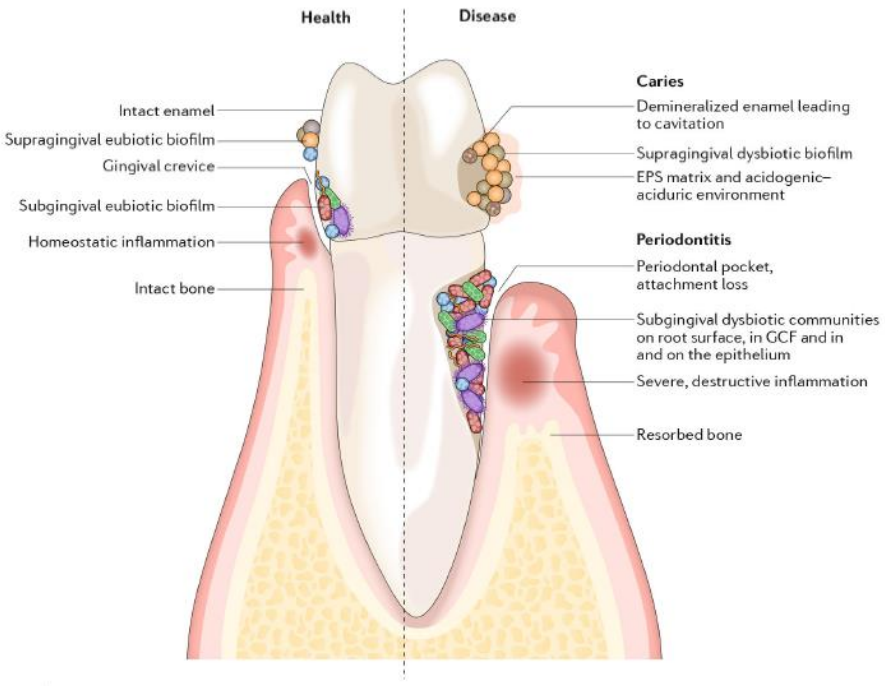


Figure 18 : Colonisation du microbiote oral au niveau de l'espace supragingival et de l'espace sous-gingival sous 2 conditions distinctes : saine et pathologique [127]

2.3.1. Carie

Le processus carieux est un processus dynamique complexe qui dépend de l'équilibre entre les facteurs d'agression des bactéries cariogènes du biofilm dentaire, influencé par l'alimentation et les défenses de l'hôte. Les caries correspondent à la déminéralisation des tissus durs de la dent. Elles sont causées par une dysbiose du biofilm supragingival, associée à une consommation excessive de sucres et/ou à une mauvaise hygiène bucco-dentaire. Dans le cas où la consommation de sucres est faible et peu fréquente, les communautés microbiennes sur les dents restent stables. La baisse épisodique du pH par la production d'acides par certaines bactéries peut être facilement neutralisée par la salive, qui restaure et maintient la minéralisation de l'émail. Cependant, une consommation importante et répétée de glucides fermentescibles entraîne souvent une augmentation de la production d'acides, une diminution du pouvoir tampon salivaire et donc une diminution du pH. Cette acidification de l'environnement, perturbe l'équilibre entre les commensaux et les pathogènes [133,134]. La composition du biofilm supragingival évolue en faveur d'une augmentation de pathogènes cariogènes comme *Streptococcus mutans, Actinomyces,* et *Lactobacillus. Bifidobacterium spp, Scardovia spp* et *Candida albicans* sont également présents en plus grande quantité [135–137]. Cette acidification accrue s'accompagne aussi d'une perte de diversité et d'une réduction du niveau et de l'activité métabolique des bactéries bénéfiques, qui préfèrent se développer à un pH neutre. Si le biofilm n'est pas éliminé et que la consommation fréquente de sucres se poursuit, il s'ensuit un état d'acidification prolongé et répété à l'origine de la déminéralisation de l'émail et donc de la carie (Figure 19).



Figure 19 : Exemple de caries

2.3.2. Parodontite

Contrairement au reste de la cavité buccale, les micro-organismes qui se développent dans le sulcus et adhèrent à la surface de la racine évoluent dans un environnement moins riche en oxygène et davantage protégé des forces de cisaillement que ceux que l'on trouve au niveau supragingival. La santé parodontale est associée à une prédominance de cocci et bâtonnets Gram-positifs comme *Actinomyces naeslundi* qui, en s'agrégeant à d'autres espèces bactériennes de la famille des streptocoques, fait partie des colonisateurs primaires de la surface radiculaire et va servir de support au développement du biofilm de la plaque dentaire. Après 2 à 3 semaines d'accumulation de plaque se traduisant cliniquement par l'apparition d'une gingivite, le microbiote parodontal se modifie et la proportion de spirochètes, cocci et bâtonnets Gram-négatifs augmente.

La parodontite est une maladie bucco-dentaire résultant d'une dysbiose affectant la flore sous-gingivale associée à une réaction immuno-inflammatoire délétère de l'hôte, conduisant à la destruction progressive et irréversible du système d'attache dentaire (le parodonte) et provoquant, en l'absence de traitement, la perte des dents (Figure 20).



Figure 20 : Exemple de parodontite

Au niveau de la lésion parodontale, de profonds remaniements sont observés au niveau du microbiote avec l'émergence d'espèces bactériennes Gram-négatives mais aussi d'autres micro-organismes (virus, protozoaires…) [138]. Si les espèces bactériennes associées à la santé parodontale sont toujours présentes, la dysbiose parodontale est caractérisée par une augmentation de la proportion de bactéries anaérobies Gram-négatives historiquement décrites en 1979 comme appartenant au "complexe rouge" de Socranski : *Treponema denticola (Td), Porphyromonas gingivalis (Pg), Tannerella forsythia (Tf)* et *Fusobacterium nucleatum (Fn)*[139]. *Prevotella intermedia, Filifactor alocis, Desulfobulbus sp*. HOT 041 et *Fretibacterium sp*. HOT 360 sont aussi retrouvés en abondance dans les parodontites et le nombre important de spirochètes semble être associé à la sévérité de la destruction parodontale [140–142]. Cependant, le séquençage métagénomique a permis de mettre en évidence de nouveaux concepts concernant la dysbiose parodontale associée à la parodontite. Cette dysbiose est le résultat d'une modification qualitative et quantitative d'une communauté polymicrobienne, incluant des bactéries commensales et pathogènes [143]. Au niveau parodontal, la dysbiose provient davantage d'un changement d'espèces dominantes que d'une colonisation bactérienne *de novo* (Figure 21). Contrairement à ce que l'on observe au niveau intestinal, la parodontite est associée à une augmentation de la diversité de son microbiote [144,145]. Cette plus grande diversité résulterait de l'apport supplémentaire en nutriments provenant de la destruction des tissus environnants et de l'augmentation physique de la taille de la lésion parodontale [127,141].

Dans la parodontite, la communauté microbienne interfère avec la réponse immunitaire de l'hôte. Les stratégies immuno-subversives et pro-inflammatoires créent des conditions favorables à la croissance des pathogènes. En effet, il a été montré que certaines bactéries Gram-négatives sont capables de modifier la réponse des neutrophiles et le système du complément (mécanisme de protection dans l'immunité antibactérienne faisant intervenir un ensemble de protéines) afin de favoriser un environnement inflammatoire propice à la croissance bactérienne [89,127]. Par exemple *Pg* est capable d'altérer l'activité bactéricide des leucocytes innés tout en favorisant leur réponse inflammatoire [127,146]. Les protéases bactériennes de *Pg* (gingipaïne), *Tf* (karilysine) et *Pi* (interpaïne A) peuvent bloquer l'activation du complément par la dégradation de composants de ce dernier (C3 par exemple) [147–149].

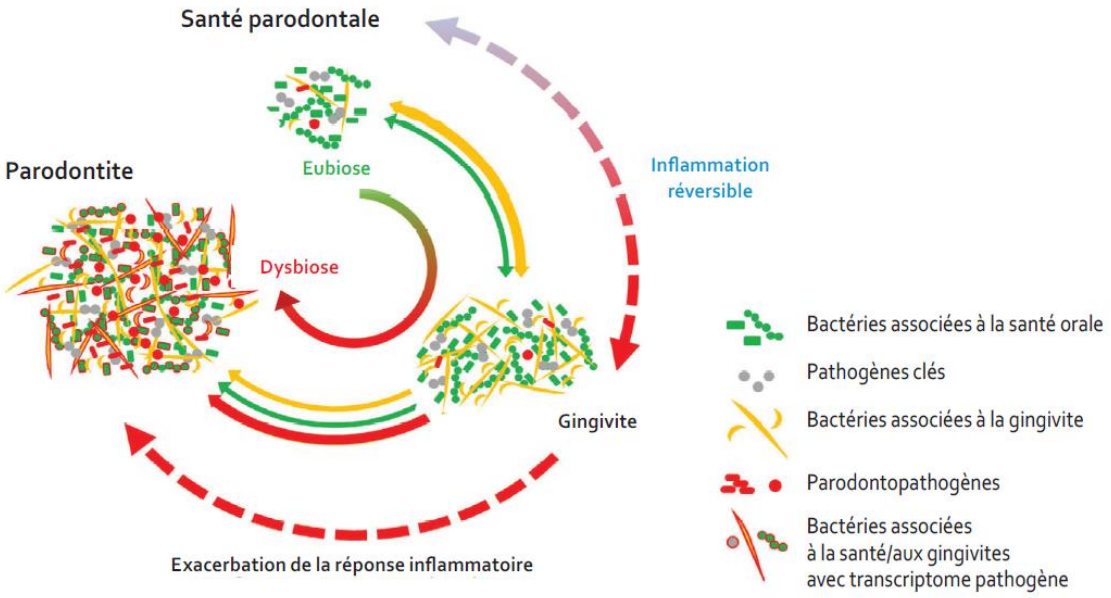
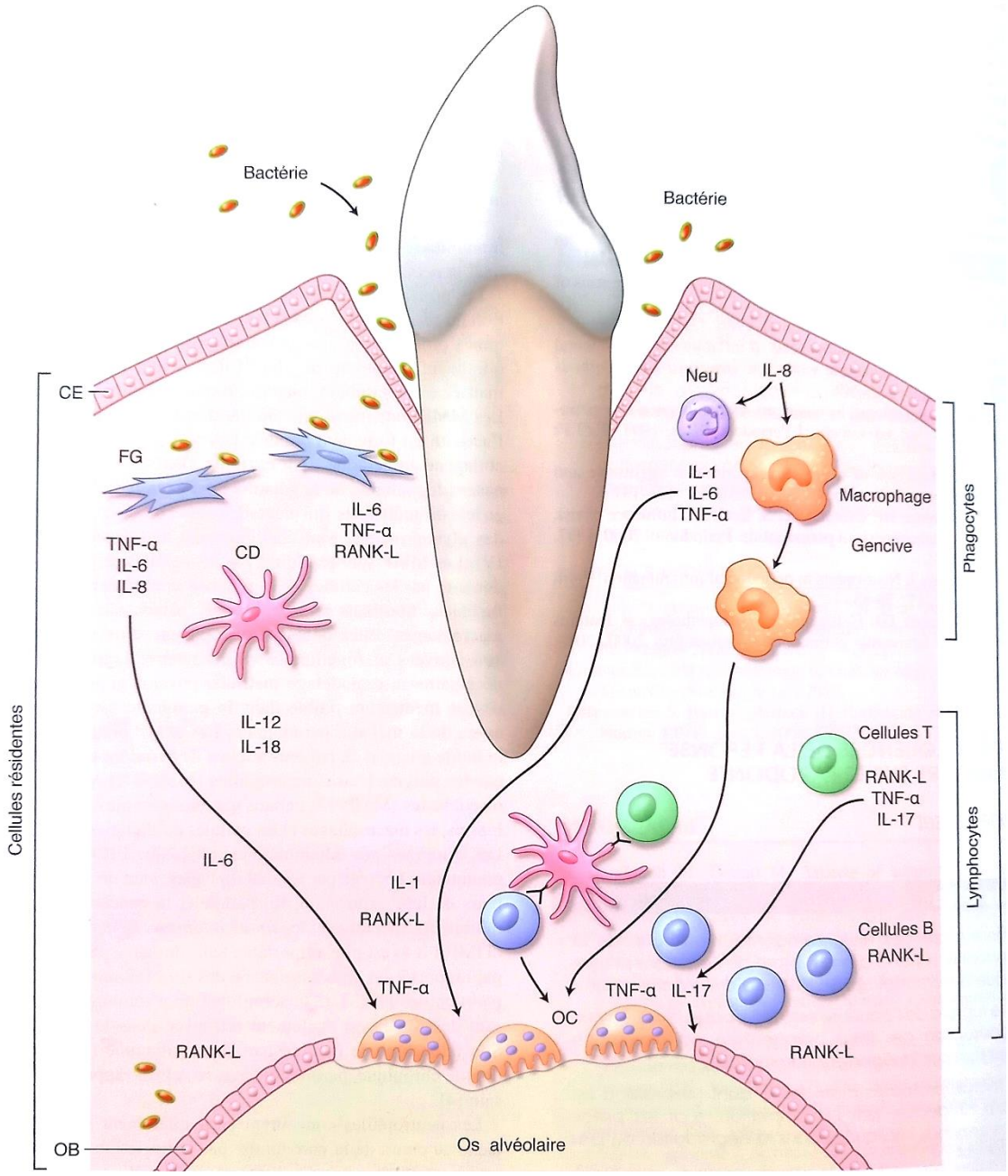


Figure 21 : Relation bidirectionnelle entre le microbiote et la réaction immuno-inflammatoire de l'hôte [141]

La destruction des tissus parodontaux est provoquée par la réponse inflammatoire exacerbée [89,127]. Suite à la persistance de la dysbiose sous-gingivale et à la diffusion de protéases et antigènes bactériens à travers l'épithélium jonctionnel, une inflammation caractérisée par l'invasion de polynucléaires neutrophiles, de macrophages puis de lymphocytes est observée dans les tissus parodontaux. Cela entraine la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α,) qui vont stimuler la production de métalloprotéinases matricielles (MMP) par les neutrophiles, macrophages et cellules du parodonte (fibroblastes, cellules épithéliales et ostéoblastes) et entrainer la dégradation des tissus conjonctifs parodontaux. De plus, en milieu inflammatoire, les cellules immunitaires (lymphocytes Th17 et B) et parodontales (ostéoblastes) favorisent l'expression de RANK-L (Receptor Activator of Nuclear factor-κB ligand). Les lymphocytes Th17 produisent également une quantité importante d'IL-17. L'augmentation du ratio RANKL/OPG (Osteoprotegerin) qui est impliqué dans le remodelage osseux, et la production importante d'IL-17 entrainent l'activation des ostéoclastes et favorisent ainsi la résorption de l'os alvéolaire (Figure 22) [132,150–152].



<u>Figure 22 :</u>Mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la destruction osseuse au cours de la parodontite [132]
(CD : cellules dendritiques ; CE : cellules épithéliales ; FC : facteurs de croissance ; OB : ostéoblastes ; OC : ostéoclastes)

Enfin, il a été démontré que les parodontites pouvaient avoir des répercussions sur de nombreuses pathologies systémiques notamment *via* l'augmentation de l'inflammation systémique [88,89].

2.3.3. Dysbiose du microbiote oral et inflammation systémique : rôle de la translocation bactérienne.

Des données récentes issues de la littérature scientifique suggèrent qu'il existe un lien entre le développement et/ou l'aggravation de certaines pathologies systémiques et la survenue d'une dysbiose orale[127]. Ces maladies ont en commun un mécanisme physiopathologique basé sur le maintien d'un état inflammatoire systémique (inflammation de bas grade) dont la résolution ou la stabilisation n'est pas possible en présence d'une dysbiose du microbiote oral. Certains auteurs suggèrent également que les micro-organismes responsables de la dysbiose du microbiote oral pourraient circuler de manière systémique ou libérer une partie de leur constituant dans la circulation sanguine et ainsi provoquer des complications loin de leur site de prolifération initial. Les métafacteurs bactériens sont toutes les parties de la bactérie qui ont une activité de virulence ou d'activation du système immunitaire au cours de la physiologie et de la physiopathologie (par exemple, LPS, flagelline, et acide teichoïque). L'un des principaux médiateurs de ce désordre immuno-inflammatoire est le LPS, qui est une endotoxine et un facteur de virulence des bactéries Gram-négatives. Le LPS est un exemple puisqu'il est susceptible de migrer vers différents organes (foie, muscles, cœur, etc.) et d'y déclencher des réactions inflammatoires [153]. En effet, les bactéries ou leurs composants, tels que les LPS présents sur la membrane externe des bactéries Gram-négatives, sont une source continue d'inflammation et d'infection qui traversent la barrière épithéliale, arrivent dans la circulation sanguine et atteignent divers organes du corps. La principale cause de cette translocation bactérienne est la dysbiose du microbiote oral. C'est-à-dire une perte de l'équilibre de la composition bactérienne due à un excès de bactéries Gram-négatives ou Gram-positives ou de facteurs de virulence (LPS, flagelline, acide teichoïque). Les bactéries orales ou les métafacteurs activent les défenses immunitaires innées par l'intermédiaire des Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) reconnus par les Pattern Recognition Receptors (PRR) des cellules immunitaires innées. Les PAMPs sont représentés par différentes molécules de surface telles que l'acide teichoïque (spécifique des Gram-positifs) ou LPS (spécifique des Gram-négatifs). Les PRR comprennent un groupe de récepteurs TLR [154]. L'interaction entre les TLR (TLR-4 et TLR-2) et les PAMPs entraîne l'activation de la voie de signalisation MyD88 (Myeloid Differentiation protein 88) et ensuite celle du facteur de transcription NF-kB, induisant une réponse inflammatoire généralisée avec la synthèse de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, tels que le TNF-α et les interleukines.

La Figure 23 représente les différentes voies possibles (par translocation bactérienne dans le sang) responsables de l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires dans les maladies systémiques résultant d'une dysbiose du microbiote oral. La transduction d'un signal inflammatoire jusqu'au noyau des cellules nécessite une succession de réactions en chaîne de phosphorylations catalysées par des protéines kinases. L'activation de l'inflammasome s'effectue selon plusieurs voies, celles des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), IKKs, et celles de JAK/STAT (Janus Kinase et Signal Transducers and Activators of Transcription).

Le microbiote oral et son équilibre jouent un rôle majeur dans l'homéostasie générale d'un individu. Toute perturbation entraîne une augmentation de certaines espèces bactériennes, notamment les espèces à Gram-négatives et est associée à la production massive de cytokines pro-inflammatoires, ce qui provoque ou maintient une inflammation chronique de bas grade.

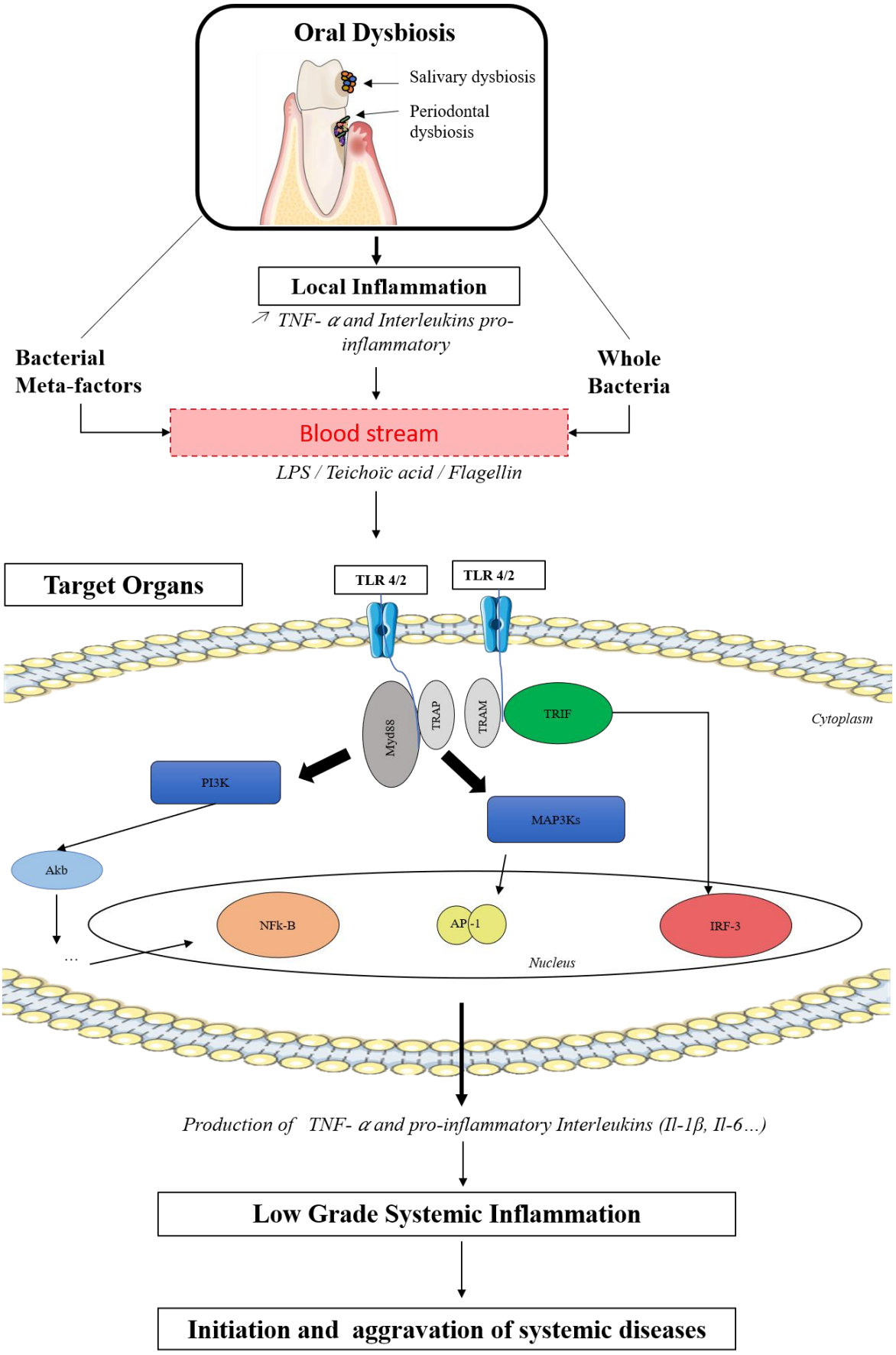


Figure 23 : Possibles mécanismes physiopathologiques liée à la translocation bactérienne (Thomas et al, Diagnostics 2021) [88]

3. CAVITE ORALE ET OBESITE

3.1. Caries et Obésité

De nombreuses études se sont intéressées à l'association entre obésité et caries dentaires. Cependant les résultats sont contradictoires, certains auteurs mettent en évidence une association positive alors que d'autres ne trouvent aucune corrélation. Il est ainsi difficile de tirer des conclusions. Les caries et l'obésité sont toutes les 2 des pathologies multifactorielles. En effet, il est difficile de déterminer si l'augmentation de la prévalence des caries chez les personnes obèses est uniquement due à la surcharge pondérale ou bien à des problèmes d'alimentation et d'hygiène qui sont souvent liés à une situation psychologique et d'image de soi extrêmement complexe dans laquelle les patients obèses se trouvent. Les études systématiques s'accordent cependant sur la nécessité d'une analyse plus approfondie de cette association et de ses variables confusionnelles [155–158].

3.2. Parodontites et Obésité

L'association positive entre obésité et maladies parodontales a été démontrée dans de nombreuses études cliniques et épidémiologiques. La dernière classification des maladies et affections parodontales et péri-implantaires (2017 European Federation of Periodontology and American Academy of Periodontology Consensus Report) souligne le rôle prédominant de l'obésité dans la perte d'attache parodontale via l'inflammation parodontale [159,160]. En effet, les personnes obèses ont un risque plus élevé de développer une parodontite sévère, et un IMC plus élevé est observé chez les sujets atteints de parodontites [161]. Selon la littérature actuelle, plusieurs mécanismes soutiennent la relation "bidirectionnelle" entre obésité et parodontite [162]. L'obésité, caractérisée par un état inflammatoire chronique de bas grade, conduit à une augmentation des médiateurs pro-inflammatoires dans les tissus parodontaux. Chez les sujets obèses atteints de parodontite, les cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α) sont retrouvées en plus grande quantité dans le sang et également dans le fluide gingival par rapport aux sujets normo-pondérés atteints de parodontite [163,164]. Dans le fluide gingival, le niveau des adipokines pro-inflammatoires (leptine, visfatine et résistine) est également augmenté chez les sujets obèses [165]. L'inflammation systémique de

bas grade associée à l'obésité augmente l'inflammation parodontale et favorise les processus de résorption osseuse causés par le recrutement de cellules immuno-inflammatoires et de certaines cytokines (IL-1β, TNF-α) [166]. De plus, l'obésité peut altérer la réponse immunitaire face aux bactéries buccales. Les acides gras libres se lient également à ces mêmes récepteurs TLR, entraînant une tolérance conduisant à une réponse immuno-inflammatoire inappropriée face à l'agression bactérienne, et donc à une aggravation de la destruction parodontale [167,168].

Enfin, des études *in vivo* et *in vitro* ont également été réalisées. Il a été observé que chez les rats obèses, l'inflammation du tissu adipeux était significativement aggravée par la parodontite, avec une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et TNF-α [169,170]. Enfin, *in vitro*, les bactéries orales Gram-négatives et les métafacteurs, tels que le LPS, dans les tissus adipeux peuvent induire une réponse inflammatoire chronique de bas grade par les macrophages et une production accrue d'adipokines pro-inflammatoires dans les adipocytes [171].

Nous constatons une association entre un état bucco-dentaire altéré et l'obésité. Par conséquent, le microbiote oral, en lien avec l'altération de l'état bucco-dentaire, ne serait-il pas un acteur de l'obésité ?

Dans la partie suivante, nous nous sommes intéressés à la composition du microbiote oral chez les obèses.

4. MICROBIOTE ORAL DYSBIOTIQUE ET OBESITE

4.1. Composition du microbiote oral chez les personnes obèses

Dans la littérature, il a été décrit qu'il existait, comme au niveau intestinal, une modification du microbiote oral chez les personnes atteintes d'obésité avec un ratio Firmicute/Bactéroides augmenté [172]. Une dysbiose orale entraine un changement organisationnel de cet écosystème pouvant potentialiser l'effet de certaines espèces ou associations bactériennes comme *Pg*, *Pi, Tf,* et par la suite interagir avec certaines pathologies systémiques [173]. Certaines familles telles que Prevotellaceae et Peptostreptococcaceae sont en proportion plus importante dans le microbiote salivaire de personnes obèses [172]. *Capnocytophaga* et *Tf,*

bactéries Gram-négatives ont également été trouvées en plus grande proportion chez les sujets obèses atteints de parodontites [174,175]. Il a aussi été trouvé une prévalence plus élevée de *Pg* dans le microbiote oral sous-gingival des femmes obèses comparé aux femmes normo-pondérées [175]. Enfin, une autre étude révèle des changements dans la composition salivaire des femmes en surpoids avec notamment une concentration élevée de *Selenomonas noxia* qui fait partie de la famille des Firmicutes [176]. Récemment, des études ont suggéré l'implication du genre sexuel dans la relation entre l'obésité et le microbiote oral [177,178]. Par exemple, certains genres tels que *Neisseria* et *Rothia* semblent être affectés par le genre sexuel chez les sujets obèses [178].

En résumé il a été observé dans la littérature qu'il existait des différences de composition de microbiote oral entre les personnes obèses et normo-pondérés. Ce changement de microbiote oral n'aurait-il pas un rôle causal dans l'obésité ?

4.2. Microbiote oral dysbiotique et obésité : un lien de causalité ?

Comme nous avons pu le voir précédemment, la causalité du microbiote intestinal dysbiotique a été démontrée dans l'obésité. Un des mécanismes moléculaires mis en évidence est la dysbiose du microbiote intestinal à l'origine de la translocation de bactéries Gram-négatives ou de facteurs de virulence (LPS) à travers la muqueuse intestinale, entraînant une inflammation locale et systémique de bas grade appelée endotoxémie métabolique. Cette translocation bactérienne intestinale peut atteindre le tissu adipeux et déclencher une réaction immuno-inflammatoire via l'activation de récepteurs TLR-4 conduisant à la prolifération de pré-adipocytes et de macrophages et à l'augmentation de l'inflammation [40].

Comme au niveau intestinal, il existe une dysbiose orale chez les patients obèses. Il a déjà été mis en évidence dans la littérature que la translocation bactérienne depuis la bouche se fait via une augmentation de la perméabilité intercellulaire épithéliale induite par une inflammation chronique locale. Comme au niveau intestinal, le passage de LPS dans le sang peut aussi entrainer une inflammation locale et systémique de bas grade appelée endotoxémie métabolique. Cette endotoxémie associée à une réaction immuno-inflammatoire chronique peut contribuer aux désordres métaboliques. En effet, la translocation de LPS provenant de la cavité buccale favorise l'aggravation ou l'émergence d'une insulino-résistance via une

perturbation de la voie de signalisation à l'insuline [179]. Le LPS est un métafacteur présent au niveau de la membrane externe de bactéries gram-négatives notamment de *Pg* qui a été retrouvé en quantité augmentée dans le microbiote oral de femmes obèses atteintes de parodontite [175]. *Pg* est capable de sécréter du LPS mais aussi de se transloquer dans la circulation sanguine et dans différents organes. En effet, il a été détecté dans les valves cardiaques de patients atteints de maladies cardio-vasculaires illustrant ainsi la capacité de translocation des bactéries lors d'une dysbiose orale [180,181].

À ce jour, le lien de causalité entre microbiote oral dysbiotique et obésité n'est pas encore clairement établi. Les recherches sur l'identification des espèces bactériennes orales responsables sont encore rares. Différentes proportions de certaines espèces bactériennes ont été observées, mais leur causalité et leurs mécanismes d'action dans l'obésité restent à clarifier. Ainsi, le lien entre obésité et dysbiose du microbiote oral doit être davantage exploré afin d'identifier une potentielle signature du microbiote oral dans l'obésité.

Notre travail de thèse a donc porté sur la relation entre le microbiote oral et l'obésité.

III- PARTIE EXPÉRIMENTALE

AVANT PROPOS :

L'objectif principal de ma thèse est d'identifier par quels mécanismes moléculaires le microbiote oral contribue à l'obésité. Pour cela, nos travaux se sont articulés autour de deux axes alimentés par 2 questions : existe-il une signature du microbiote oral dans l'obésité chez l'Homme et cette signature du microbiote oral est-elle causale dans l'obésité ?

Dans un premier temps à travers une étude clinique pilote, nous avons réalisé une analyse détaillée du microbiote oral de sujets obèses et normo-pondérés atteints de parodontite. Dans un second temps, à travers une étude fondamentale originale, nous avons transféré le microbiote oral dysbiotique de femmes obèses et normo-pondérées dans un modèle murin afin d'évaluer sa causalité dans l'obésité (Figure 24).

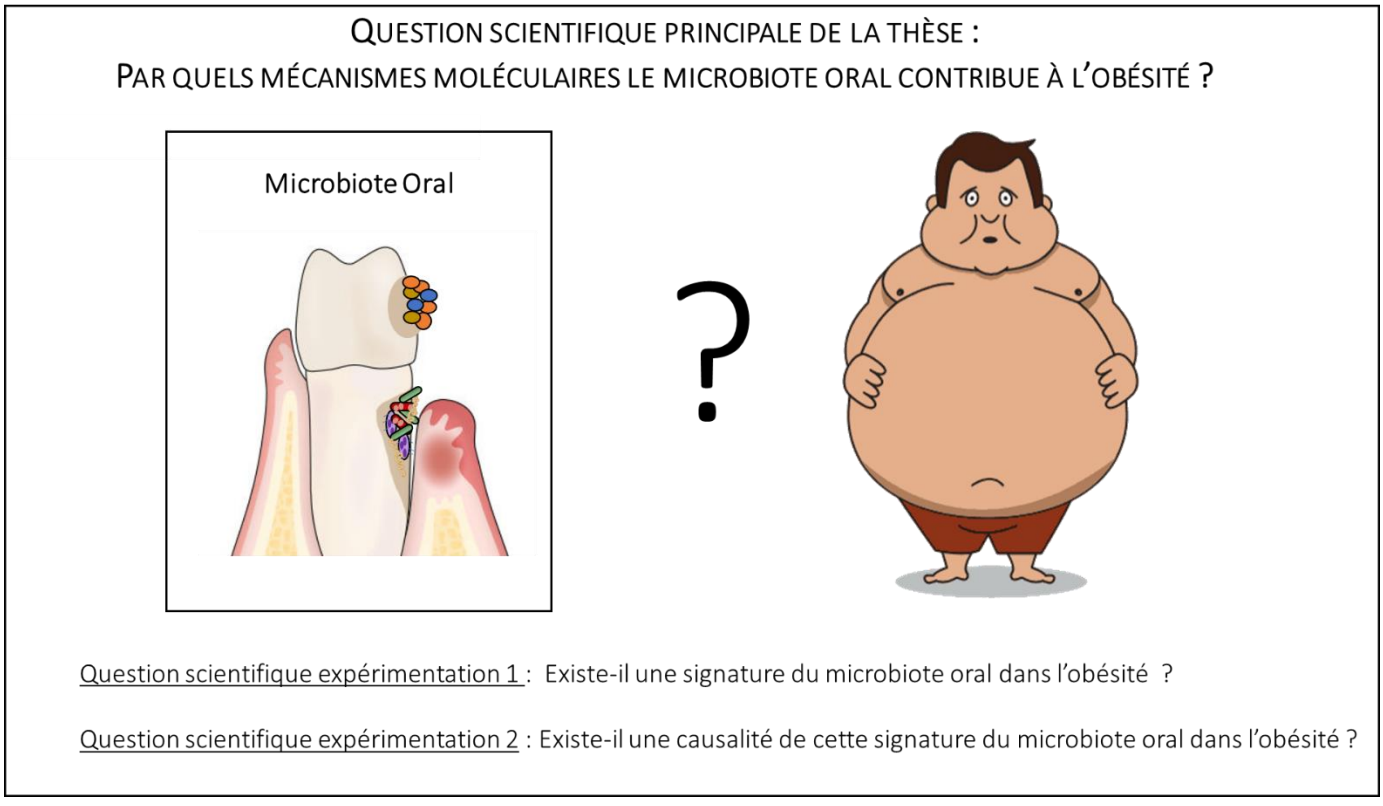


Figure 24 : Question scientifique de la thèse

1. RESULTATS EXPERIMENTAUX 1 :

L'obésité induit une signature du microbiote oral chez les femmes atteintes de parodontite :

Étude pilote

Obesity Drives an Oral Microbiota Signature of Female Patients with Periodontitis: A Pilot Study

Charlotte Thomas, Matthieu Minty, Thibault Canceill, Pascale Loubières, Vincent Azalbert, François Tercé, Camille Champion, Rémy Burcelin, Pierre Barthet, Sara Laurencin-Dalicieux & Vincent Blasco-Baque

Diagnostics 2021, 11, 745.https://doi.org/10.3390/diagnostics11050745

1.1. Introduction :

L'obésité est reconnue comme un problème majeur de santé publique. Selon l'OMS, en 2017, 1,9 milliard de personnes étaient considérées comme étant en surpoids, dont 650 millions étaient obèses. Cela représente 39% de la population adulte. En France, les résultats de la dernière enquête nationale ObÉpi réalisée en 2012 ont montré une augmentation continue du surpoids et de l'obésité chez les adultes de plus de 18 ans avec 15 % d'obèses, soit près de deux fois plus qu'en 1997 (8 %) [4]. Cette augmentation se retrouve également dans la population mondiale que ce soit dans les pays industrialisés ou dans des régions telles que l'Afrique sub-saharienne considérées comme épargnées jusqu'à présent. De nos jours, l'évolution de cette pathologie est considérée comme pandémique avec un caractère inflammatoire clair qui augmente le risque de développement d'autres maladies cardio-métaboliques telles que l'hypertension, l'athérosclérose et le diabète de type 2. Les causes de l'obésité sont multifactorielles et comprennent le mode de vie, l'alimentation, l'environnement et les facteurs génétiques. Cependant, ces étiologies ne suffisent pas à expliquer son expansion mondiale et de nouvelles recherches sont nécessaires pour identifier d'autres paramètres. Les données récentes ont montré que la dysbiose du microbiote intestinal est impliqué dans le développement de l'obésité [182,183] et caractérise les personnes obèses [184]. La dysbiose se définit par un déséquilibre qualitatif et quantitatif de la flore qui peut se traduire par une diminution de la diversité bactérienne et/ou un excès de certaines espèces pathogènes. Les personnes obèses présentent une augmentation du pourcentage du phylum Firmicutes (Gram-positif) et une diminution du phylum Bacteroides (Gram-négatif)[72]. De plus, les personnes obèses sont également caractérisées par un microbiote oral dysbiotique avec une augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes [172]. Le microbiote salivaire contient 10^{10} bactéries et entre 300 et 400 espèces différentes. La dysbiose orale entraîne un changement organisationnel de cet écosystème, qui peut potentialiser l'effet de certaines espèces, comme les bactéries anaérobies à Gram-négatif [174,185,186]. Il est intéressant de noter qu'une augmentation de ces bactéries Gram-négatives est également associée au développement d'une pathologie orale spécifique : la parodontite. La parodontite est une maladie inflammatoire chronique, non transmissible, d'origine infectieuse, qui provoque une destruction irréversible des tissus environnants la dent, conduisant finalement à la perte de celles-ci [187,188]. L'association positive entre obésité et maladies parodontales a été démontrée dans de nombreuses études cliniques et épidémiologiques [162]. Les personnes obèses sont souvent associées à un statut socio-économique inférieur à celui des personnes

normo-pondérées. Un statut socio-économique faible est également associé à une mauvaise santé bucco-dentaire et à un risque accru de développer une maladie parodontale [189–191]. Récemment, la nouvelle classification des maladies et affections parodontales et péri-implantaires (2017 European Fédération européenne de parodontologie et American Academy of Periodontology Consensus Report) souligne le rôle prédominant de l'obésité dans la perte d'attache parodontale via l'inflammation parodontale [159,160]. Les personnes obèses présentent un risque plus élevé de développer une parodontite sévère et, réciproquement, un IMC plus élevé est observé chez les sujets atteints de parodontite [161,192,193]. D'après la littérature, plusieurs mécanismes soutiennent la relation "bidirectionnelle" entre obésité et parodontite [162]. Certains auteurs ont laissé entendre que la parodontite et son microbiote dysbiotique pourraient avoir un lien avec des maladies systémiques telles que l'obésité [89,173,194]. En effet, chez les rats obèses, l'inflammation du tissu adipeux était significativement aggravée par la parodontite, avec une augmentation de l’expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et TNF-α [169,170]. Les bactéries orales Gram-négatives et les métafacteurs, tels que le LPS, dans les tissus adipeux, peuvent induire une réponse inflammatoire chronique et de bas grade par les macrophages et une production accrue d'adipokines pro-inflammatoires dans les adipocytes [171]. Cet état inflammatoire entraîne la prolifération des précurseurs des adipocytes, prédisposant à l'obésité [40].

Comme au niveau intestinal, la dysbiose salivaire peut entraîner le passage de bactéries Gram-négatives ou de facteurs de virulence à travers la muqueuse buccale, ce qui entraîne une inflammation locale et systémique de faible intensité appelée endotoxémie métabolique. La translocation bactérienne de la bouche se produit via une augmentation de la perméabilité intercellulaire épithéliale induite par la parodontite. Cette endotoxémie associée à une réaction immuno-inflammatoire chronique peut contribuer au développement et/ou à l'aggravation des troubles métaboliques. Cependant, les recherches sur l'identification des espèces bactériennes orales responsables sont encore rares. Différentes proportions de certaines espèces bactériennes ont été observées, mais leur causalité et leurs mécanismes d'action dans l'obésité restent à clarifier. Ainsi, le lien entre obésité et dysbiose du microbiote oral doit être davantage exploré afin d'identifier une potentielle signature du microbiote oral dans l'obésité.

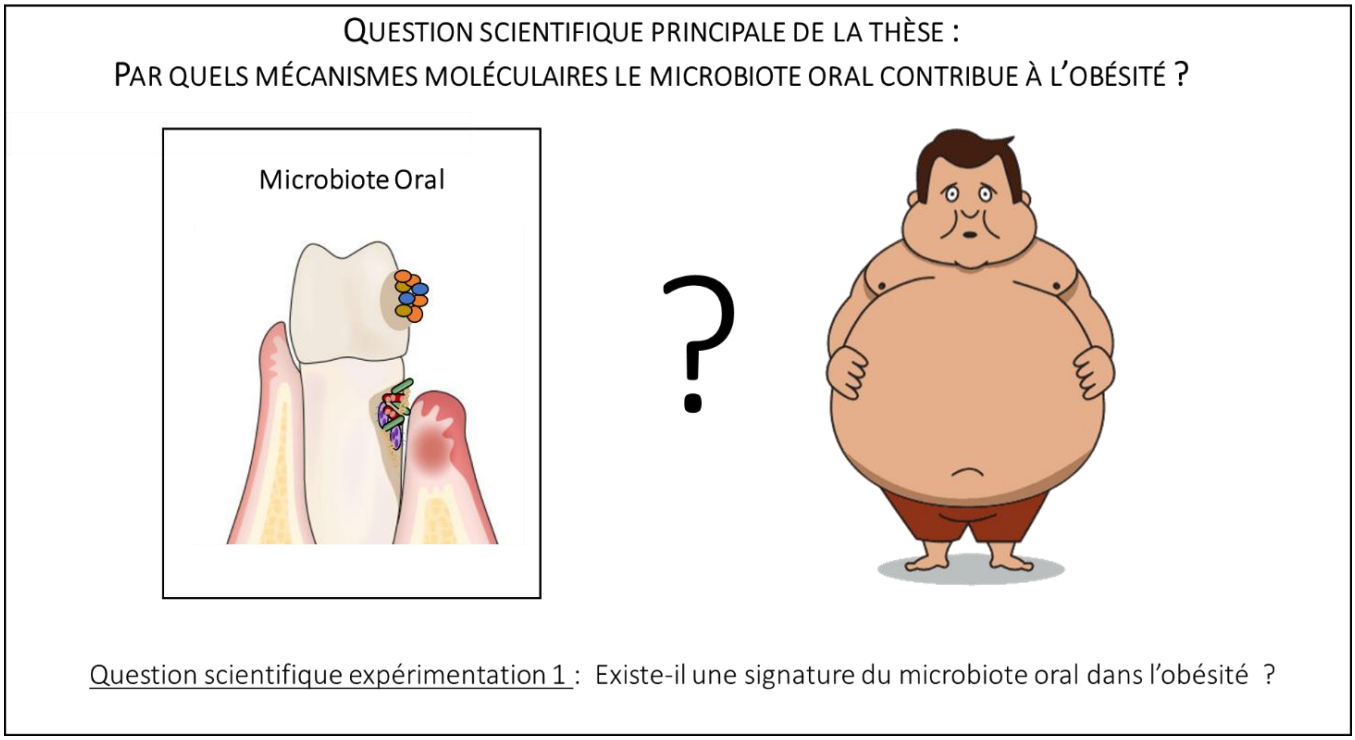


Figure 25 : Question scientifique de l'expérimentation 1

L'objectif principal de cette étude était d'analyser le statut du microbiote oral des sujets obèses en relation avec la parodontite. Pour cela, nous avons effectué une étude pilote sur 19 patients atteints de parodontite, divisés en deux groupes : des sujets normo-pondérés avec un IMC compris entre 20 et 25 (n = 9) et des sujets obèses avec un IMC > 30 (n = 10), avec un ratio homme-femme équivalent.

1.2. Matériels et Méthodes :

Nous avons suivi les directives de la déclaration STROBE pour les études observationnelles [195]. L'étude d'observation a été approuvée par la Commission Éthique du Département de Médecine Générale de Midi Pyrénées (comité d'éthique médicale local).

1.2.1. Conception de l'étude

Nous avons réalisé une étude transversale entre janvier et février 2020 au sein du service d'Odontologie (CHU de Toulouse, France) en incluant les patients qui consultaient pour des raisons parodontales. Tous les participants ont donné leur consentement éclairé pour la participation à cette étude et leur accord pour un examen bucco-dentaire et un prélèvement de salive pour des analyses biologiques.

1.2.2. Cadre de l'étude

L'étude a été menée dans la consultation de parodontologie du CHU de Toulouse (CHU de Toulouse, France) par deux investigateurs formés et calibrés (C.T., S.LD.). L'inclusion a été proposée à chaque patient répondant aux critères d'inclusion entre janvier et février 2020 sans aucun suivi prévu dans le cadre de l'étude. Comme cette étude est non interventionnelle, la prise en charge parodontale du patient n'a pas été différente, qu'il ait consenti ou non à participer.

1.2.3. Participants

Nous avons inclus dans cette étude des patients adultes atteints de parodontite qui étaient capables de comprendre et de signer le formulaire de consentement. Pour explorer les différences entre les personnes de poids normal et les obèses, nous avons exclu les patients présentant une insuffisance pondérale avec un IMC inférieur à 20 (kg/m2) et ceux en surpoids avec un IMC compris entre 25 (kg/m2) et 30 (kg/m2). Nous avons exclu les patients qui présentaient un diabète (afin d'explorer purement l'obésité), des maladies hépatiques ou une stéatose (avec une étiologie d'infections virales et de maladies auto-immunes), des infections virales chroniques (virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus de l'hépatite B (VHB), virus de l'hépatite C (VHC) et mononucléose), insuffisance rénale chronique (clairance de la

créatinine inférieure à 60 ml/min), maladies gastro-intestinales chroniques ou aiguës, antécédents de chirurgie gastro-intestinale modifiant l'anatomie, et ceux qui étaient sous traitement antidiabétique ou d'inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) ou qui avaient pris des pré-biotiques, des pro-biotiques ou des antibiotiques dans le mois précédant l'inclusion. Les femmes enceintes ou allaitantes et les personnes sous tutelle ou curatelle étaient également exclues. Les participants ont été divisés en deux groupes en fonction de leur IMC compris entre 20 et 25 ou supérieur à 30.

1.2.4. Variables et mesures des données

Le principal objectif de cette étude était d'analyser la composition taxonomique du microbiote oral dans les deux groupes de patients : obèses et normo-pondérés. Le prélèvement a été réalisé lors de la consultation d'inclusion qui s'est déroulée comme suit :

Caractéristiques médicales et sociodémographiques

Les antécédents médicaux et dentaires ont été évalués (pathologies associées, médicaments, niveau de stress noté sur une échelle visuelle analogique allant de 0 à 10) ainsi que le mode de vie et le comportement nutritionnel, qui ont été enregistrés à partir d'un questionnaire. Les habitudes d'hygiène bucco-dentaire ont été également évaluées : fréquence des visites chez le chirurgien-dentiste, fréquence et type de matériel utilisé (par exemple, brosse à dents manuelle ou électrique, bain de bouche, brossettes interdentaires).

Caractéristiques de la santé orale

Pour chaque patient, des examens oraux et parodontaux complets ont été réalisés. Une sonde PCP15 a été utilisée pour un bilan de sondage de toute la bouche (6 mesures par dent) afin de déterminer la profondeur de sondage, la perte d'attache parodontale, l'indice de saignement au sondage (BOP), l'indice de plaque (IP), le score de lyse osseuse en fonction de l'âge du patient et le diagnostic parodontal (Stade et Grade). L'indice DMF (Decayed-Missing-Filled) et l'examen radiologique ont également été réalisés. Deux parodontistes qualifiés (C.T., S.L.D.) ont procédé aux examens bucco-dentaires. Préalablement, elles ont été calibrées pour le bilan de sondage (profondeur de sondage, perte d'attache parodontale et BOP), obtenant un kappa inter-individuel global de 0,9. Les examinatrices ont également vérifié avant le début de l’étude qu'elles avaient exactement le même protocole pour l'examen clinique.

Analyse du microbiote oral

La salive non stimulée a été extraite et recueillie dans des tubes stériles le jour de l'examen oral. Les échantillons ont ensuite été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C pour l'analyse taxonomique du microbiote oral. L'ADN total a été extrait de la salive congelée à l'aide d'un kit Qiamp Cador Pathogen Mini (QIAGEN réf 54106, Les Ulis, France) selon les recommandations du fabricant. Ensuite, les régions hypervariables V2 à V4 de l'ADN ribosomal bactérien 16S (16S rDNA) ont été analysées comme décrit précédemment [179,196]. Le séquençage Miseq des échantillons a été réalisé par Vaiomer (Labège, France).

1.2.5. Gestion et analyse des données

Pipelines bio-informatiques

Les relevés MiSeq métagénomiques ciblés 16S à partir des échantillons oraux ont été analysés à l'aide du pipeline bio-informatique établi par Vaiomer sur la base de l'outil FROGS v1.4.0 [197]. En bref, après démultiplexage des lectures appariées « Illumina » à code-barres, les séquences de lecture R1 et R2 ont été coupées en 10 et 40 bases respectivement pour enlever les bases de qualité inférieure. Des lectures propres ont été appariées pour chaque échantillon indépendamment en fragments plus longs à l'aide de FLASH. Les amplicons résultants ont été nettoyés en supprimant les amplifications non spécifiques, c'est-à-dire les fragments de moins de 350 et plus de 500 bases, ou sans les deux séquences d'amorce PCR (10% d'inadéquations autorisées). Les unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) ont été produites par regroupement à liaison unique à l'aide de l'algorithme Swarm v2.1.6 en deux passages : la première passe est un regroupement avec une distance d'agrégation égale à 1 et la seconde passe avec une distance d'agrégation égale à 3. Les OTUs identifiés comme chimères (avec VSEARCH v1.9.5) dans tous les échantillons dans lesquels ils sont présents, ont été enlevés. Les OTUs dont l'abondance est inférieure à 0,005% de l'abondance totale des ensembles de données ont été supprimés. Enfin, une attribution taxonomique a été effectuée afin de déterminer les profils communautaires à l'aide de Blast+ v2.2.30+ par rapport à la banque de données Silva 128.

Analyses statistiques

Les données ont été traitées en aveugle afin de préserver la confidentialité des participants. Les analyses statistiques ont été corrigées avec le taux d'erreur de découverte (FDR), une méthode permettant de conceptualiser le taux d'erreur de type I dans les tests d'hypothèse nulle lors de comparaisons multiples [198]. Les analyses de la diversité bactérienne (Chao1, alpha diversité, bêta diversité de Bray-Curtis) ont été réalisées à l'aide du logiciel R Phyloseq v1.14.0 (Bioconductor, open source software for Bioinformtics). Les analyses différentielles des taxons ont été réalisées avec l'outil d'analyse discriminante linéaire de taille d'effet (LEfSe) [120] en utilisant les paramètres par défaut (seuil de signification du paramètre alpha fixé à 0,05 et seuil de score logarithmique LDA fixé à 2,0). Des tests de Mann-Whitney non appariés ont été réalisés à l'aide de GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, États-Unis). Un test PERMANOVA a été effectué avec 999 permutations pour évaluer la différence statistique entre les groupes dans les analyses ACoP de la diversité bêta (Figures 26D, 27E et 29E). Ensuite, nous avons effectué une analyse exploratrice des données en utilisant l'ACP pour identifier les paramètres qui caractérisent le mieux les sujets obèses et les sujets normo-pondérés (Figures 26E, 27F, 28, et 29F). Parmi ces variables, on retrouve les groupes bactériens identifiés par le cladogramme dans le microbiote oral et des paramètres cliniques tels que le sexe, l'IMC, le stress, le nombre de dents cariées, manquantes et obturées, le tabac, l'indice de plaque (IP) et le saignement au sondage (BOP), la perte d'attache et la profondeur de sondage.

1.3. Résultats :

Les sujets obèses présentent un risque parodontal accru avec plus de dents absentes, associé à une plus grande quantité de *Capnocytophaga* dans le microbiote oral par rapport aux sujets normo-pondérés.

Comme indiqué dans le Tableau 3, l'âge moyen des sujets n'était pas significativement différent entre le groupe obèse et normo-pondéré : 59,4 ans ± 11,65 avec 50 % de femmes (n=5) dans le groupe obèse contre 57,11 ans ± 10,49 avec 44 % de femmes (n=4) dans le groupe normo-pondéré. Étant donné les critères de sélection, le poids corporel moyen (91,4 kg ± 9,38) et l'IMC (30,02 ± 1,48) des sujets obèses (OS) étaient significativement plus élevés que chez les sujets normo-pondérés (NWS) (67,33 kg ± 6,93 et 23,11 ± 1,29, respectivement, $p < 0,001$ pour les deux). Aucune différence significative entre OS et NWS n'a été observée en ce qui concerne le score de stress, le comportement alimentaire et les habitudes de vie.

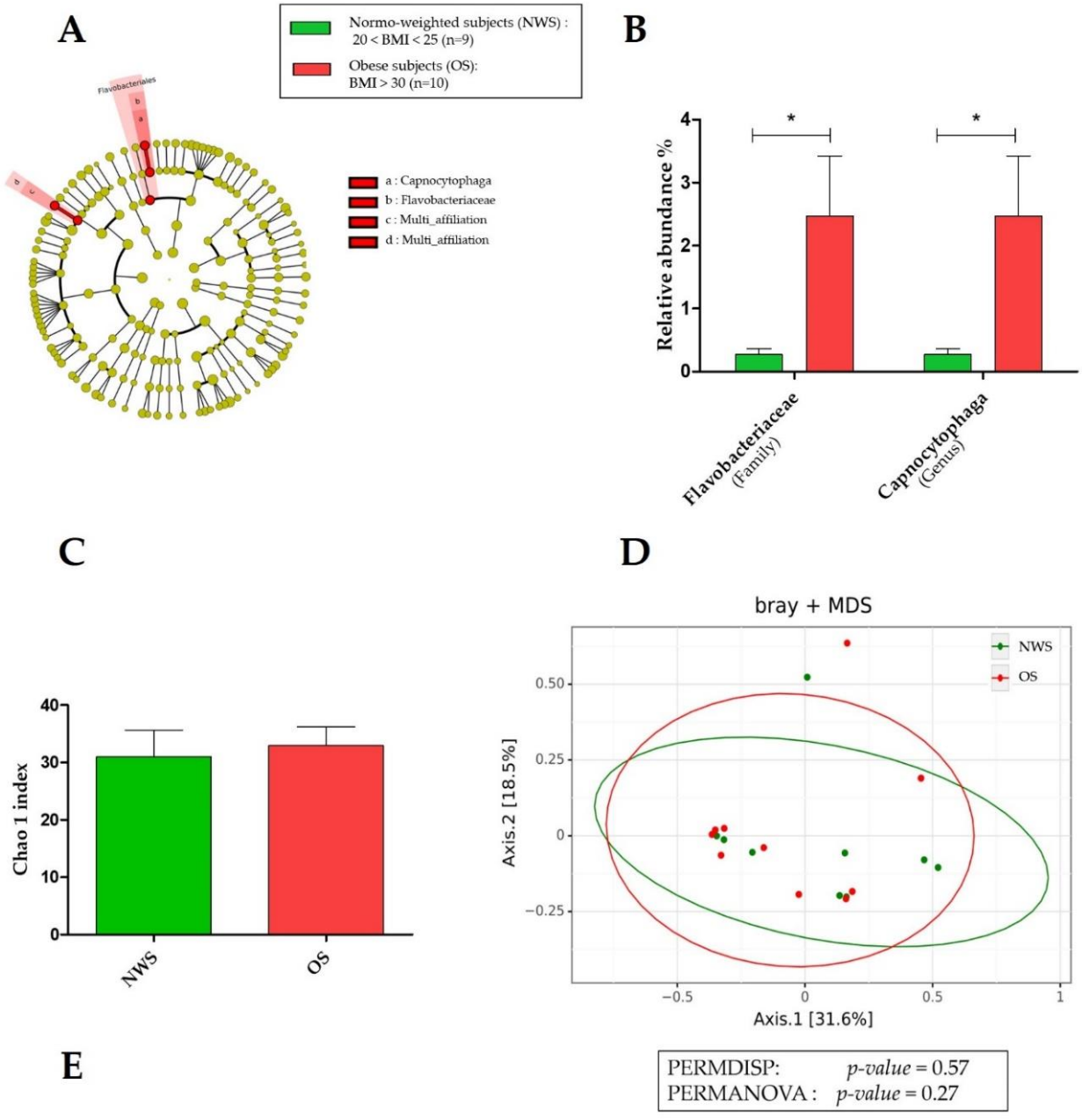
Pour explorer le lien entre obésité et santé bucco-dentaire, différents paramètres cliniques ont été analysés (Tableau 3). L'indice DMF était similaire entre les sujets obèses et normo-pondérés (14,11 ± 5,84 contre 12,89 ± 6,23, $p = 0,69$). Cependant, le nombre de dents manquantes était significativement plus élevé chez les patients obèses (6,00 ± 3,77 contre 2,44 ± 2,50, $p = 0,03$). En ce qui concerne l'état parodontal, l'OS présentait un score significativement plus élevé de lyse osseuse en fonction de l'âge ; correspondant à une parodontite de Grade C (1,03 ± 0,35 vs. 0,72 ± 0,23, $p = 0,04$) par rapport à NWS (Grade B). Le Grade C de la parodontite correspond à une progression la plus rapide de la pathologie. Enfin, la perte d'attache (5,39 mm ± 2,05 vs. 4,68 mm ± 1,29, $p = 0,74$), l'IP (16,8 % ± 14,41 vs. 14,67 % ± 14,56, $p = 0,43$) et le BOP (34,2 % ± 22,16 contre 23 % ± 17,73, $p = 0,19$) n'étaient pas significativement différents entre OS et NWS.

Parameters	Normo-weighted subjects (NWS) 20 < BMI < 25	Obese subjects (OS) BMI > 30	p-value
n	9	10	
Sex (number of women, %)	4 (44.44%)	5 (50%)	>0.99
Age (years)	57.11 ± 10.49	59.40 ± 11.65	0.57
Weight (Kg)	67.33 ± 6.93	91.40 ± 9.38	**<0.001*** **
Height (cm)	170.56 ± 8.52	168.90 ± 10.17	0.51
BMI (kg /m^2)	23.11 ± 1.29	30.02 ± 1.48	**< 0.001*** **
Smoking (number of smokers, %)	6 (67%)	6 (60%)	0.81
Stress on a scale from 0 to 10 (EVA)	3.78 ± 3.93	4.60 ± 2.50	0.46
Frequency of physical activity	1.39 ± 1.76	2.20 ± 2.97	0.76
Meal time (min)	31.89 ± 8.19	27 ± 4.83	0.09
DMF index	12.89 ± 6.23	14.11 ± 5.84	0.69
Number of Decayed teeth	0 ± 0	1.00 ± 1.80	0.07
Number of Missing teeth	2.44 ± 2.50	6.00 ± 3.77	***0.03**
Number of Filled teeth	10.44 ± 4.15	7.11 ± 4.88	0.19
Score of periodontal support loss in relation to the patient's age	0.72 ± 0.23 (Grade B)	1.03 ± 0.35 (Grade C)	***0.04**
Probing depth (mm)	3.72 ± 1.02	3.75 ± 1.25	0.97
Loss of attachment (mm)	4.68 ± 1.29	5.39 ± 2.05	0.74
Plaque index (%)	14.67 ± 14.56	16.80 ± 14.41	0.71
Bleeding on probing (%)	23.00 ± 17.73	34.20 ± 22.16	0.19
Brushing frequency			
Once a day	1(1.11%)	3 (30%)	0.55
2 times a day	7 (77.78%)	5 (50%)	
3 times a day	1 (11.11%)	2 (20%)	
Dental check-up frequency			
Less than once every 2 years	0	1 (10%)	0.72
Once every 2 years	1 (11.11%)	1 (10%)	
Once a year	6 (66.67%)	4 (40%)	
2 times a year	2 (22.22%)	4 (40%)	

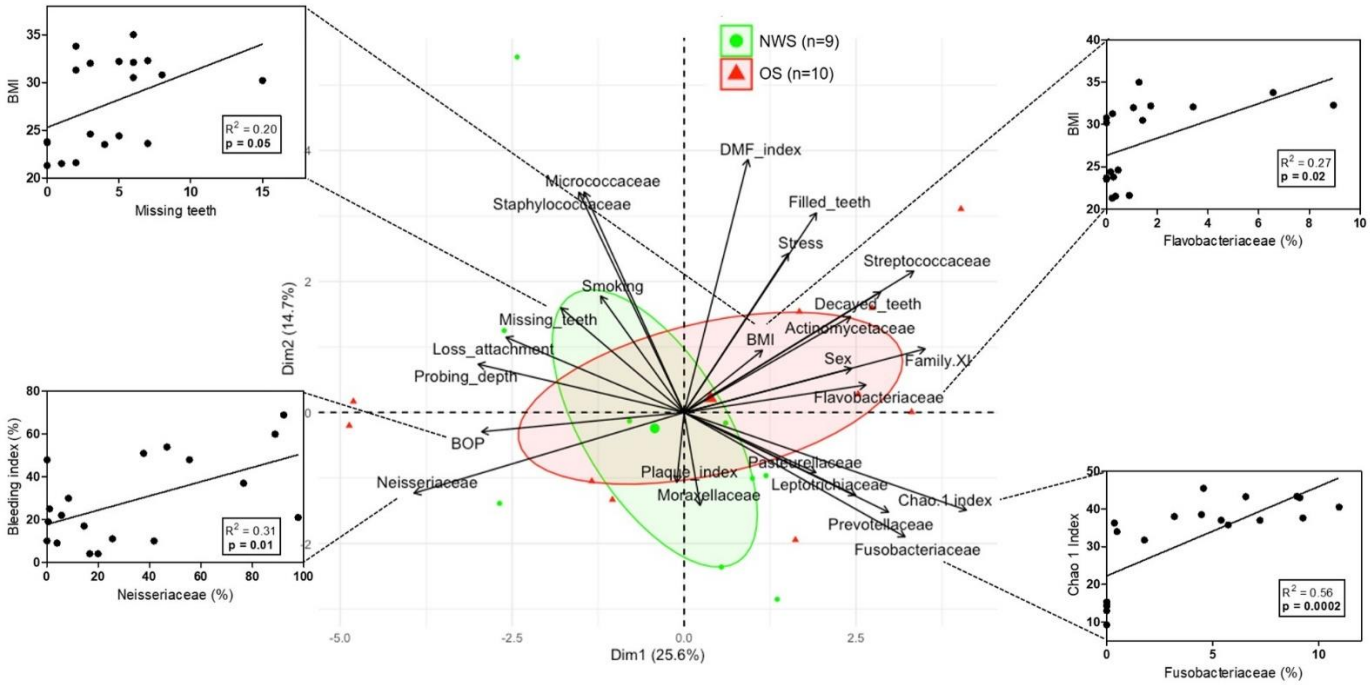
Tableau 3 : Paramètres généraux et oraux entre les sujets normo-pondérés (NWS ; n = 9) et les sujets obèses (OS ; n = 10).
*(Données en moyenne ± SD, * p < 0,05, *** p < 0,0001 test de Mann-Whitney non apparié et test exact de Fisher. Les valeurs p significatives ont été mises en évidence en gras.)*

Pour évaluer l'association entre microbiote oral et obésité, nous avons effectué une analyse taxonomique du microbiote oral dans les deux groupes (Figure 26 et annexe Tableau 7). L'abondance relative de la famille des Flavobacteriaceae (2,47 % ± 3,02 vs. 0,27 % ± 0,29, p = 0,04) et du genre *Capnocytophaga* (2,47 % ± 3,02 vs. 0,27 % ± 0,29, p = 0,04) était plus élevée dans les OS par rapport aux NWS, et le genre *Capnocytophaga* était le seul genre à être présent dans la famille des Flavobacteriaceae (Figure 26 A, B). Le genre *Helicobacter* et l'espèce *Helicobacter pylori* n'ont pas été détectés dans le microbiote oral des deux groupes.

En outre, aucune différence n'a été observée pour la diversité alpha selon l'indice Chao 1 (32,93 ± 10,45 vs. 30,94 ± 14,16, p = 0,93) et la diversité bêta (p = 0,27) dans le microbiote oral entre le groupe obèse et le groupe normo-pondéré (Figure 26 C, D).



E



<u>Figure 26 :</u> Microbiote oral chez les sujets obèses (OS ; n = 10) par rapport aux sujets normo-pondérés (NWS ; n = 9).
*(A) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe). (B) Abondance relative (%) pour la famille taxonomique et le genre, identifiés avec des différences significatives dans le microbiote salivaire. (C) Représentation de l'indice Chao 1 de la diversité alpha. (D) Représentation de l'indice de Bray-Curtis de la diversité bêta (E) Analyse en composantes principales (ACP) entre les genres bactériens dominants du microbiote buccal et les paramètres cliniques buccaux et analyse de corrélation de Pearson. Données en moyenne ± SD, * p < 0,05, test de Mann-Whitney non apparié.*

Pour explorer l'interaction entre les paramètres cliniques et microbiens liés à l'obésité, nous avons effectué une analyse multivariée par analyse en composantes principales (ACP) (Figure 26E). Nous avons identifié un cluster spécifique pour chaque groupe de sujets. L'analyse de corrélation de Pearson a ensuite été réalisée afin d'estimer les relations entre tous les paramètres qui influencent directement la distribution des groupes. L'abondance relative des Neisseriaceae a été positivement et significativement corrélée avec l'indice BOP. L'abondance des Fusobacteriaceae était corrélée positivement et significativement avec la diversité du microbiote selon l'indice Chao 1. Le nombre de dents manquantes et l'abondance relative des Flavobacteriaceae sont positivement et significativement corrélés avec l'IMC. Nous avons observé que le paramètre clinique le plus proche associé aux Flavobacteriaceae était le genre sexuel. Nous avons donc émis l'hypothèse d'un lien entre le genre sexuel et le

microbiote oral, et nous avons analysé l'implication du genre sexuel dans le groupe des sujets obèses.

Les femmes obèses ont un nombre plus élevé de dents cariées et obturées comparé aux hommes obèses associés à un microbiote oral dysbiotique.

Outre le poids et la taille qui étaient plus élevés chez les hommes obèses, les paramètres généraux globaux étaient similaires chez les femmes (OF) et les hommes (OM) obèses, à l'exception du score de stress, qui était significativement plus élevé chez les femmes (6,40 ± 1,52 contre 2,8 ± 1,92, p = 0,01) (Tableau 4).

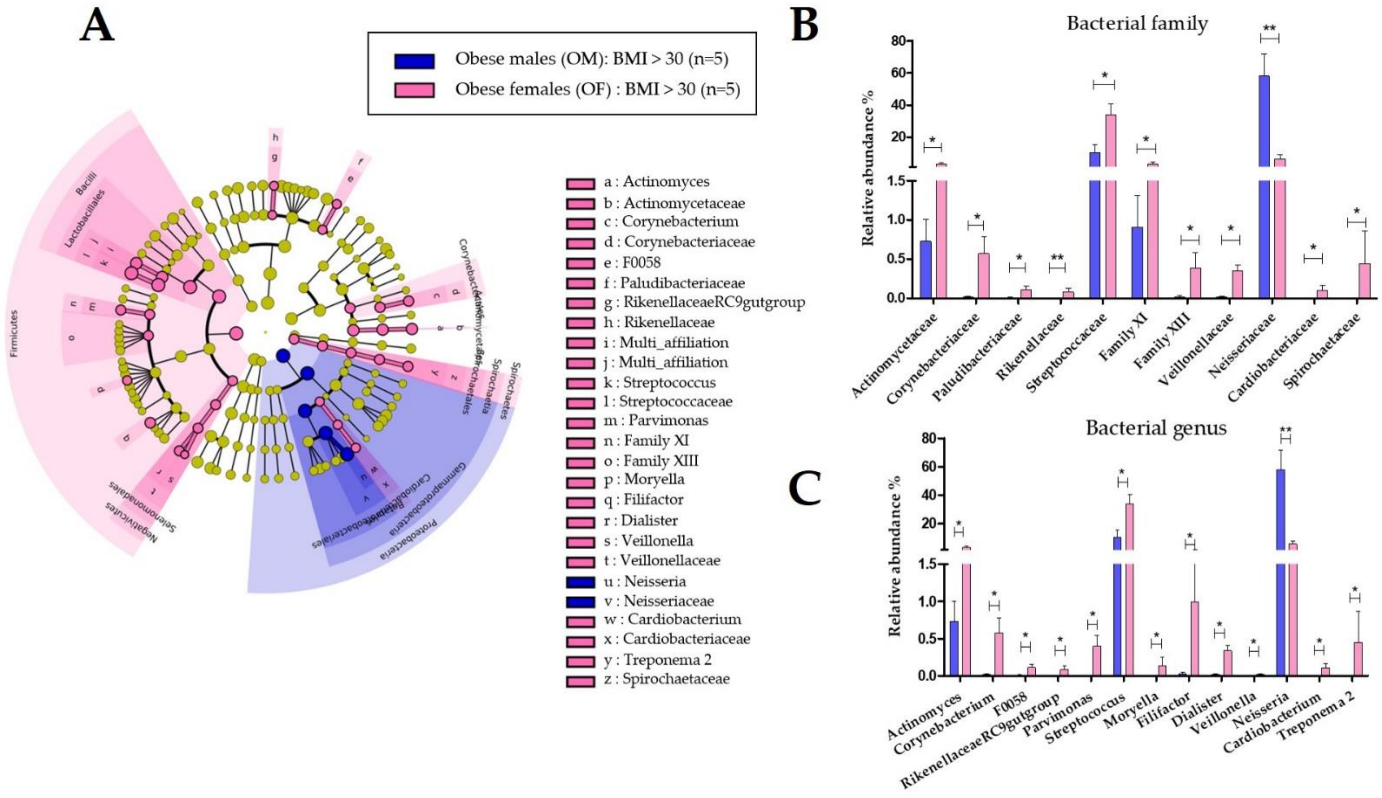
Afin d'étudier les différences liées au genre sexuel des sujets obèses, l'état de santé bucco-dentaire a été analysé. Les OF présentaient un indice DMF plus élevé que les OM (18,50 ± 3,11 contre 10,6 ± 5,12, p= 0,08) en raison d'une augmentation du nombre de dents cariées (2,25 ± 2,21 contre 0, p = 0,04) et de dents obturées (11,75 ± 2,50 contre 3,40 ± 2,07, p = 0,01). Cependant, en ce qui concerne l'état parodontal, OM présentait des cas apparemment plus graves de parodontite, mesurés par la perte d'attache (6,10 mm ± 2,60 contre 4,68 mm ± 1,20, p = 0,46), le score de lyse osseuse en fonction de l'âge du patient (1,16 ± 0,40 vs. 0,90 ± 0,28, p = 0,24), le nombre de dents manquantes (7,2 ± 4,86 vs. 4,80 ± 2,16, p = 0,59), l'indice de plaque (21 % ± 13,73 vs. 12,6 % ± 15,32, p = 0,34) et l'indice de saignement au sondage (49 % ± 22,33 contre 19,4 % ± 7,64, p = 0,07) par rapport à l'OF.

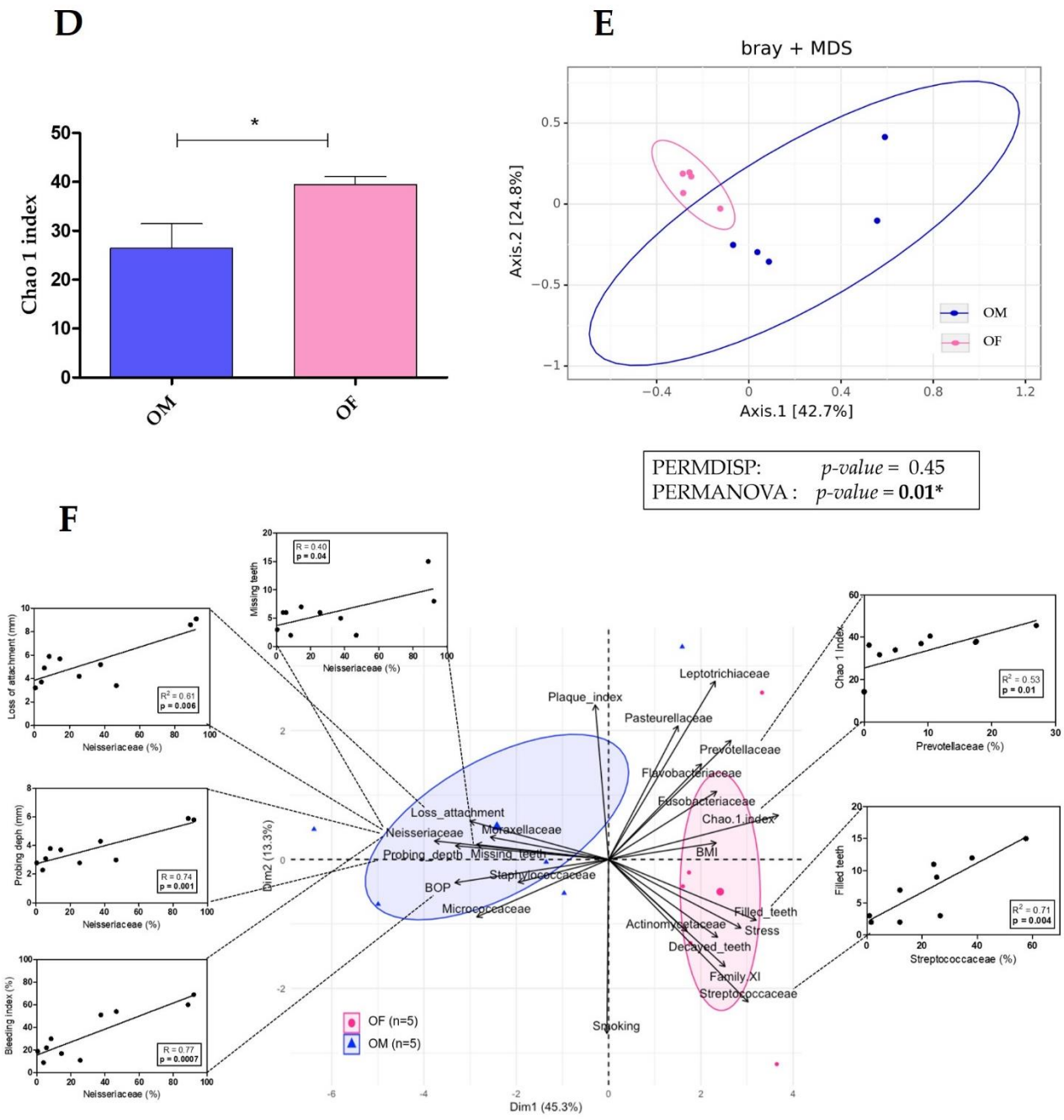
Parameters	Obese males (OM) BMI > 30	Obese females (OF) BMI > 30	p-value
n	5	5	
Age (years)	56.80 ± 10.42	62.00 ± 13.41	0.59
Weight (Kg)	96.80 ± 10.26	86.00 ± 4.47	**0.04***
Height (cm)	175.60 ± 9.53	162.20 ± 5.45	**0.01***
BMI (kg /m^2)	31.32 ± 0.85	32.72 ± 1.73	0.17
Smoking (number of smokers, %)	3 (60%)	3 (60%)	0.90
Stress on a scale from 0 to 10 (EVA)	2.80 ± 1.92	6.40 ± 1.52	**0.01***
Frequency of physical activity	2.40± 3.36	2.00 ± 2.91	0.82
Meal time (min)	26.00 ± 6.52	28.00 ± 2.74	0.81
DMF index	10.60 ± 5.12	18.50 ± 3.11	0.08
Number of Decayed teeth	0 ± 0	2.25 ± 2.21	**0.04***
Number of Missing teeth	7.20 ± 4.86	4.80 ± 2.16	0.59
Number of Filled teeth	3.40 ± 2.07	11.75 ± 2.50	**0.01***
Score of periodontal support loss in relation to the patient's age	1.16 ± 0.40 (Grade C)	0.90 ± 0.28 (Grade B)	0.24
Probing depth (mm)	4.36 ± 1.48	3.14 ± 0.63	0.20
Loss of attachment (mm)	6.10 ± 2.60	4.68 ± 1.20	0.46
Plaque index (%)	21.00 ± 13.73	12.60 ± 15.32	0.34
Bleeding on probing (%)	49.00 ± 22.33	19.40 ± 7.64	0.07
Brushing frequency			
Once a day	3 (60%)	0	
2 times a day	1 (20%)	4 (80%)	0.16
3 times a day	1 (20%)	1 (20%)	
Dental check-up frequency			
Less than once every 2 years	1 (20%)	0	
Once every 2 years	0	1 (20%)	0.33
Once a year	1 (20%)	3 (60%)	
2 times a year	3 (60%)	1 (20%)	

Tableau 4 : Comparaison des paramètres généraux et oraux entre les hommes obèses (OM ; n = 5) et les femmes obèses (OF ; n = 5).
*Données en moyenne ± SD, * p < 0,05, test de Mann-Whitney non apparié et test exact de Fisher. Les valeurs p significatives ont été mises en évidence en gras.*

Nous avons ensuite analysé le microbiote oral chez OF et OM. L'abondance relative de de nombreuses familles de bactéries orales était significativement plus élevée chez OF comparé à OM (Figure 27 A,B) : Actinomycetaceae (3,38% ± 2,10 vs. 0,73% ± 0,62, p = 0,05), Corynebacteriaceae (0,57% ± 0,47 vs. 0,02% ± 0,03, p = 0,01), Paludibacteriaceae (0,11% ± 0,11 vs. 0,007% ± 0,02, p = 0,01), Rikinellaceae (0,08% ± 0,11 vs. 0,001% ± 0,001, p = 0,009), Streptococcaceae (34,12% ± 14,29 vs. 10,55% ± 10,42, p = 0,05), Famille XI (3,44% ± 2,24 vs. 0,91% ± 0,91, p = 0,03), Famille XIII (0,39% ± 0,43 vs. 0,02% ± 0,03, p = 0,01),

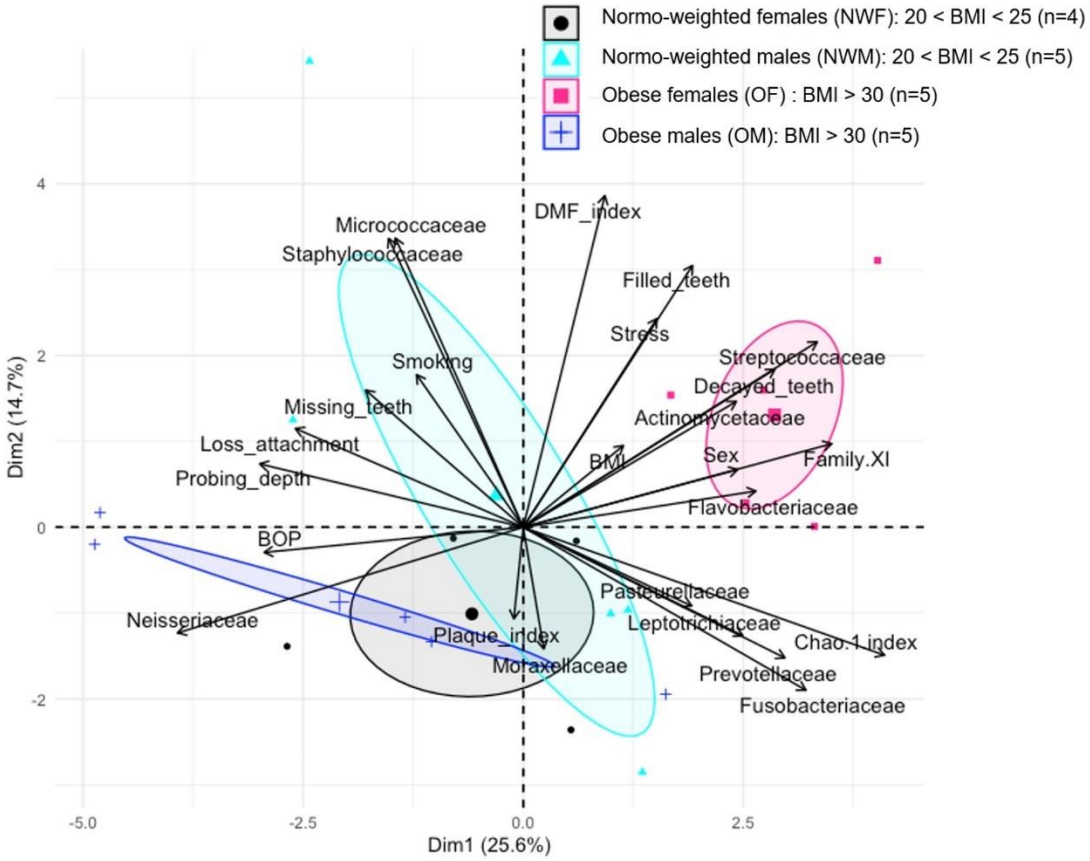
Veillonellaceae (0,36% ± 0,16 vs. 0,02% ± 0,02, *p* = 0,01), Cardiobacteriaceae (0,11% ± 0,14 vs. 0,01% ± 0,01, *p* = 0,01), et Spirochaetaceae (0,45 % ± 0,13 vs. 0 % ± 0, *p* = 0,02) (Tableau supplémentaire S2). La famille Neisseriaceae était la seule à être significativement plus faible chez OF par rapport à OM (6,63% ± 5,27 vs. 58,20% ± 30,47, *p* = 0.008). Une abondance relative plus élevée dans le groupe OF a été observée de manière similaire pour les genres bactériens oraux (Figure 27 A,C) : *Actinomyces* (3,38 % ± 2,10 vs. 0,73 % ± 0,62, *p* = 0,05), *Corynebacterium* (0,57 % ± 0,47 vs 0,02% ± 0,03, *p* = 0,01), *F0058* (0,11% ± 0,11 vs. 0,007% ± 0,01, *p* = 0,01), *Parvimonas* (0,40% ± 0,33 vs. 0,006% ± 0,005, *p* = 0,01), *Streptococcus* (34,12% ± 14,29 vs. 10,55% ± 10,42, *p* = 0,05), *Moryella* (0,14% ± 0,24 vs. 0% ± 0, *p* = 0,02), *Filifactor (*0,99% ± 1,18 vs. 0,03% ± 0,03, *p* = 0,01), *Dialister* (0,33 % ± 0,15 vs. 0,02 % ± 0,02, *p* = 0,01), *Veillonella* (0,02 % ± 0,02 vs. 0,001 % ± 0,002, p = 0,009), *Cardiobacterium* (0,11 % ± 0,14 vs. 0,005 % ± 0,007, *p* = 0,01), et *Treponema 2* (0,45% ± 0,13 vs. 0% ± 0, *p* = 0,02) (Annexe Tableau 8). En ce qui concerne la famille Neisseriaceae le genre *Neisseria* était le seul à être significativement plus faible dans le groupe OF par rapport au groupe OM (5,75% ± 5,03 vs. 58,05% ± 30,64, *p* = 0,008). De plus, la diversité alpha était significativement plus élevée dans OF que dans OM (39,45 ± 3,74 contre 26,41 ± 11,21, *p* = 0,03 pour l'indice Chao 1) (Figure 27D), et la diversité bêta était également significativement différente (p = 0,01) (Figure 27E).





<u>Figure 27</u> : Comparaison du microbiote oral entre les hommes obèses (OM ; n= 5) et les femmes obèses (OF ; n= 5).
*(A) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe). (B,C) Abondance relative (%) pour la famille taxonomique et le genre, identifiés avec des différences significatives dans le microbiote salivaire. (D) Représentation de l'indice Chao 1 de la diversité alpha. (E) Représentation de l'indice de Bray-Curtis de la diversité bêta. (F) Analyse en composantes principales (ACP) et analyse de corrélation de Pearson entre les genres bactériens dominants du microbiote oral et les paramètres cliniques oraux. Données en moyenne ± SD, * p < 0,05, ** p < 0,01, test de Mann-Whitney non apparié.*

Pour identifier les paramètres cliniques et de microbiote associés au genre sexuel dans l'obésité, nous avons effectué une analyse en composantes principales (ACP) et une analyse de corrélation de Pearson (Figure 27F). L'ACP a montré que l'abondance relative des Neisseriaceae (famille bactérienne clé dans le groupe OM) était positivement et significativement corrélée avec les paramètres déterminant l'état parodontal (nombre de dents manquantes, profondeur de sondage, perte d'attache et BOP). L'abondance relative des Streptococcaceae (une famille bactérienne clé dans le groupe OF) était corrélée positivement et significativement avec le nombre de dents obturées. Plus intéressant encore, lors de la réalisation d'une analyse en composantes principales (ACP) séparant les quatre groupes (hommes normo-pondérés, femmes normo-pondérées, hommes obèses, et femmes obèses), nous avons observé que les femmes obèses formaient clairement un groupe indépendant (Figure 28).



<u>Figure 28</u> : Analyse en composantes principales (ACP) entre les familles bactériennes dominantes du microbiote oral et les paramètres cliniques oraux dans 4 groupes : femmes normo-pondérées (NWF ; n= 4), hommes normo-pondérés (NWM ; n = 5), femmes obèses (OF ; n = 5) et hommes obèses (OM ; n = 5).

L'obésité est associée à une santé bucco-dentaire altérée et à un microbiote oral dysbiotique chez les femmes

Lors de l'analyse des paramètres généraux globaux chez les femmes normo-pondérées par rapport aux femmes obèses, nous n'avons trouvé aucune différence significative, à l'exception du critère de sélection IMC (32.72 ± 1,73 vs. 22,58 ± 1,36, p = 0,01) et le poids corporel moyen (86 kg ± 4,47 vs. 61 kg ± 2,45, p = 0,01) (Tableau 5). L'indice DMF (18,50 ± 3,11 vs. 8 ± 2,16, p = 0,02) ainsi que le nombre de dents manquantes (4,80 ± 2,16 vs. 0,25 ± 0,5, p = 0,01) et de dents obturées (11,75 ± 2,50 vs. 7,75 ± 1,70, p = 0,05) des OF étaient significativement plus élevées que celles des femmes normo-pondérées (NWF). Bien qu'aucune dent cariée n'ait été observée dans le groupe normo-pondéré, la valeur plus élevée dans le groupe obèse (2,25 ± 2,21) est apparue non significative (p = 0,06). En outre, aucune différence significative n'a été observée pour les autres paramètres relatifs à leur état parodontal.

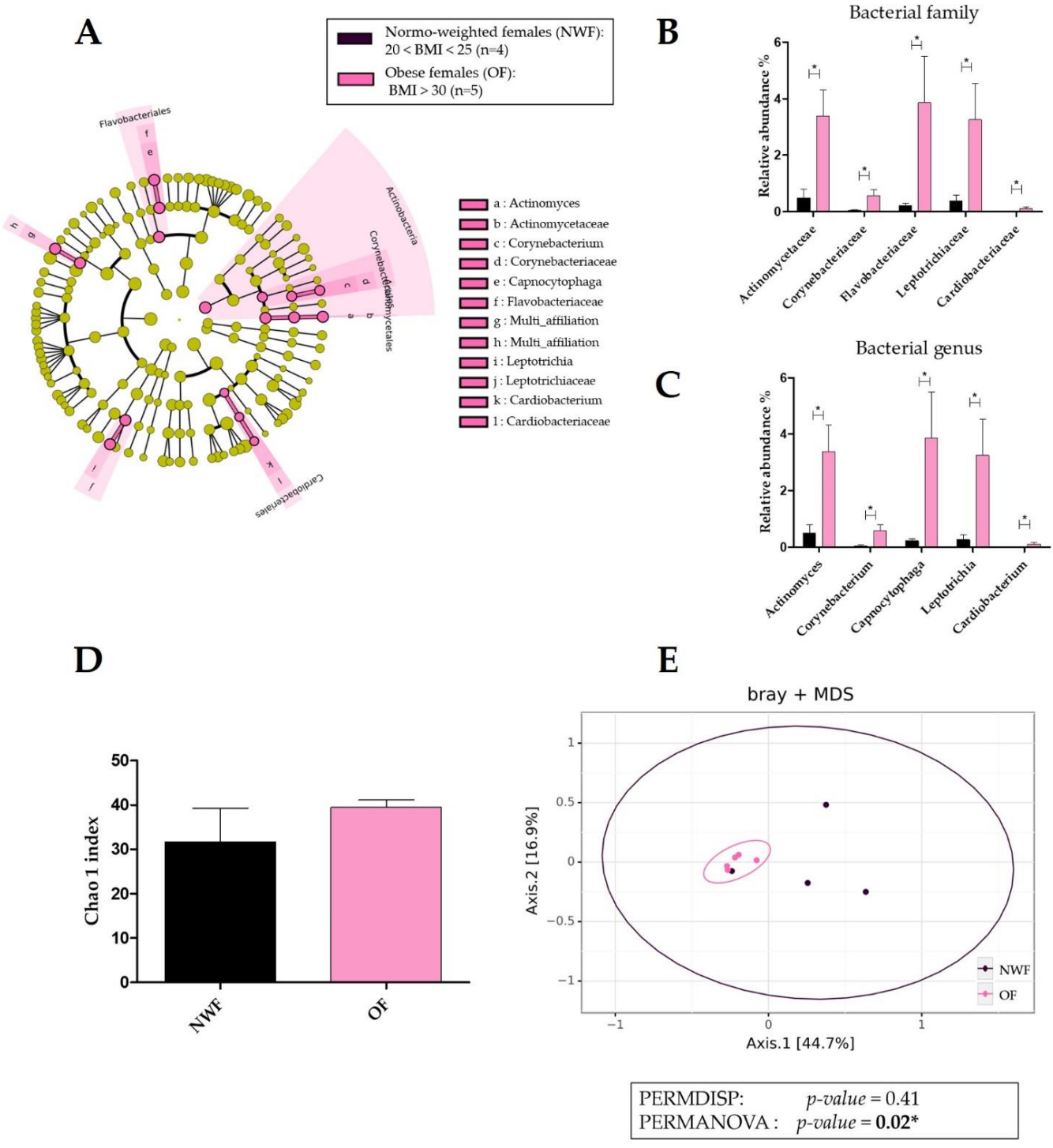
Pour explorer l'association entre obésité et microbiote oral chez les femmes, nous avons comparé les différences de microbiote entre les femmes normo-pondérées (NWF) et les femmes obèses (OF) (Annexe Tableau 9). L'abondance relative de cinq familles de bactéries orales était significativement plus élevée chez les OF que chez les NWF : Actinomycetacea (3,38 % ± 2,10 vs. 0,49 % ± 0,62, p = 0,03), Corynebacteriaceae (0,57% ± 0,47 vs. 0,04% ± 0,06, p = 0,03), Flavobacteriaceae (3,86% ± 3,66 vs. 0,22% ± 0,15, p = 0,01), Leptotrichiaceae (3,25% ± 2,85 vs. 0,38% ± 0,42, p = 0,01), et Cardiobacteriaceae (0,11% ± 0,14 vs. 0,004% ± 0,003, p = 0,01) (Figure 29A,B). De même, l'abondance relative de cinq genres bactériens oraux était significativement plus élevée chez le groupe OF comparé à celui de NWF : *Actinomyces* (3,38 % ± 2,10 vs. 0,49 % ± 0,62, p = 0,03), *Corynebacterium* (0,57 % ± 0,47 vs. 0,04% ± 0,06, p = 0,03), *Capnocytophaga* (3,86% ± 3,66 vs. 0,22% ± 0,15, p = 0,01), *Leptotrichia* (3,25% ± 2,85 vs. 0,26 ± 0,35, p = 0,01), et *Cardiobacterium* (0,11% ± 0,14 vs. 0,004% ± 0,003, p = 0,01) (Figure 29A,C). Aucune différence n'a été observée dans la diversité alpha entre les deux groupes (31,69 ± 15,28 vs. 39,45 ± 3,74, p = 0,55 pour l'indice Chao 1) (Figure 29D). En revanche, la diversité bêta du microbiote était significativement différente avec un cluster étroit chez les femmes obèses (p = 0,02) (Figure 29E).

Parameters	Normo-weighted females (NWF) 20 > BMI > 25	Obese females (OF) BMI > 30	p-value
n	4	5	
Age (years)	56.00 ± 13.88	62.00 ± 13.41	0.31
Weight (Kg)	61.00 ± 2.45	86.00 ± 4.47	**0.01***
Height (cm)	164.50 ± 6.76	162.20 ± 5.45	0.62
BMI (kg /m^2)	22.58 ± 1.36	32.72 ± 1.73	**0.01***
Smoking (number of smokers, %)	3 (75%)	3 (60%)	0.76
Stress on a scale from 0 to 10 (EVA)	5.25 ± 4.27	6.40 ± 1.52	0.62
Frequency of physical activity	1.00 ± 0.82	2.00 ± 2.91	0.89
Meal time (min)	30.00 ± 4.08	28.00 ± 2.74	0.41
DMF index	8.00 ± 2.16	18.50 ± 3.11	**0.02***
Number of Decayed teeth	0 ± 0	2.25 ± 2.21	0.06
Number of Missing teeth	0.25 ± 0.50	4.80 ± 2.16	**0.01***
Number of Filled teeth	7.75 ± 1.70	11.75 ± 2.50	**0.05***
Score of periodontal support loss in relation to the patient's age	0.75 ± 0.23 (Grade B)	0.90 ± 0.28 (Grade B)	0.38
Probing depth (mm)	4.10 ± 1.24	3.14 ± 0.63	0.26
Loss of attachment (mm)	4.60 ± 1.69	4.68 ± 1.20	0.90
Plaque index (%)	12.00 ±11.22	12.60 ± 15.32	0.90
Bleeding on probing (%)	24.50 ± 18,12	19.40 ± 7.64	0.62
Brushing frequency			
Once a day	1 (25%)	0	0.68
2 times a day	2 (50%)	4 (80%)	
3 times a day	1 (25%)	1 (20%)	
Dental check-up frequency			
Less than once every 2 years	0	0	0.71
Once every 2 years	1 (25%)	1 (20%)	
Once a year	1 (25%)	3 (60%)	
2 times a year	2 (50%)	1 (20%)	

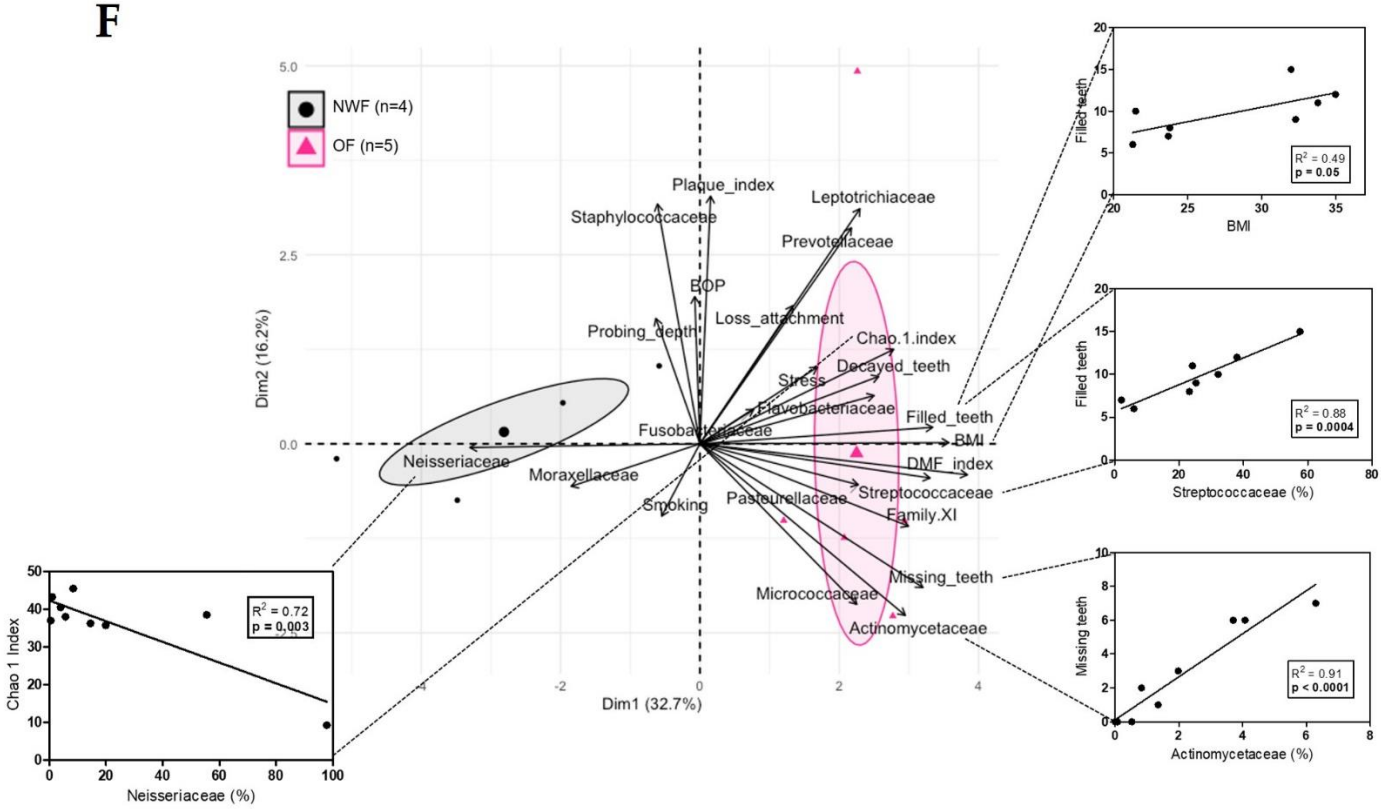
Tableau 5 : Comparaison des paramètres généraux et oraux entre les femelles normo-pondérées (NWF ; n=4) et les femelles obèses (OF ; n=5).
*Données en moyenne ± SD, *p<0,05, test de Mann-Whitney non apparié et test de Fisher exact. Les valeurs p significatives ont été mises en évidence en gras.*

Pour évaluer le lien entre l'obésité et l'ensemble des paramètres (cliniques et microbiens) chez les femmes, nous avons effectué une analyse en composantes principales et une corrélation de Pearson (Figure 29F). L'ACP a permis d'identifier deux groupes distincts représentés par les femmes obèses et normo-pondérées. Nous avons observé que l'abondance d'Actinomycetaceae était corrélée positivement et significativement avec le nombre de dents manquantes. L'abondance des Streptococcaceae et l'IMC étaient positivement et significativement corrélés avec le nombre de dents obturées. En outre, l'abondance des

Neisseriaceae était négativement et significativement corrélée à la diversité du microbiote, selon l'indice Chao 1.



F



<u>Figure 29 :</u> Comparaison du microbiote oral entre des femmes normo-pondérées (NWF ; n = 4) et des femmes obèses (OF ; n = 5).
*(A) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe). (B,C) Abondance relative (%) pour la famille taxonomique et le genre, identifiés avec des différences significatives dans le microbiote salivaire. (D) Représentation de l'indice Chao 1 de la diversité alpha. (E) Représentation de l'indice de Bray-Curtis de la diversité bêta (F) Analyse en composantes principales (ACP) et analyse de corrélation de Pearson entre les genres bactériens dominants du microbiote oral et les paramètres cliniques oraux. Données en moyenne ± SD, * p < 0,05, test de Mann-Whitney non apparié.*

1.4. Discussion

Dans notre étude, nous avons montré que l'obésité est associée à un mauvais état de santé bucco-dentaire caractérisé par le nombre de dents manquantes, le score de lyse osseuse en fonction de l'âge et une augmentation du genre *Capnocytophaga* (famille des Flavobacteriaceae). En outre, nous avons établi une relation entre le genre sexuel et le microbiote oral dysbiotique chez des patients obèses atteints de parodontite. Parmi eux, les hommes obèses étaient caractérisés par une augmentation globale du genre *Neisseria* associée à un état parodontal plus sévère par rapport aux femmes obèses, qui présentaient une augmentation du genre *Streptoccocus* généralement plus souvent associé au développement de caries. Le tabagisme est un facteur de risque bien connu pour le développement de la parodontite et dans la dysbiose orale. Cependant, les différences significatives au niveau clinique et microbiologique présentées dans notre étude pilote semblent indépendantes du statut tabagique du sujet, puisque la proportion de fumeurs et de non-fumeurs était équivalente dans tous les groupes.

Nos données confirment celles trouvées dans d'autres études précédentes indiquant que les sujets obèses présentent des cas plus sévères de parodontite que les sujets normo-pondérés, indépendamment de leurs habitudes d'hygiène bucco-dentaire [161]. Une étude récente a montré que l'obésité est également associée à un risque plus élevé de perte de dents sur cinq ans [199]. Dans notre étude, les sujets obèses avaient significativement plus de dents manquantes que les sujets normo-pondérés. De plus, les sujets obèses ont une vitesse de progression de leur parodontite (Grade C) plus importante que les sujets normo-pondérés (Grade B) à des stades comparables [188]. Le Grade de la parodontite permet d'estimer le risque de développer une parodontite, la vitesse de progression, ainsi que la fréquence des visites de contrôle chez le dentiste. Les mécanismes soutenant la relation "bidirectionnelle" entre obésité et parodontite n'ont pas encore été totalement explorés [162]. L'obésité, caractérisée par un état inflammatoire chronique de bas grade, libère des médiateurs pro-inflammatoires des tissus adipeux vers le sang, ciblant les tissus parodontaux. Chez les sujets obèses atteints de parodontite, les cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α) ont été retrouvées en plus grande quantité dans le sang et également dans le fluide gingival par rapport aux sujets normo-pondérés atteints de parodontite [163,164]. Dans le fluide gingival, le taux d'adipokines pro-inflammatoires (leptine, visfatine et résistine) est également augmenté chez les sujets obèses [165,200]. L'augmentation des cytokines et des adipokines

pro-inflammatoires dans les tissus parodontaux favorise les processus de résorption osseuse causés par le recrutement de cellules immuno-inflammatoires [166,201]. L'altération de l'homéostasie parodontale est l'une des premières étapes du passage à un microbiote oral dysbiotique, avec une augmentation des bactéries à Gram-négatif impliquées dans la parodontite. Les bactéries Gram-négatives se disséminent et envahissent les tissus oraux par le biais de l'inflammation locale.

Dans notre étude, nous avons montré que l'obésité est associée à une augmentation globale significative du genre *Capnocytophaga* chez les sujets obèses par rapport aux sujets normo-pondérés, particulièrement chez les femmes obèses. *Capnocytophaga* est une bactérie Gram-négative impliquée dans la parodontite et elle a également été trouvée en plus grande proportion chez les sujets obèses [175]. D'autres comme *Wu et al.* ont observé une proportion plus élevée de certaines familles comme les Prevotellaceae et les Peptostreptococcaceae dans le microbiote salivaire des personnes obèses [172]. *Tf* a également été trouvé dans une proportion plus élevée chez les sujets obèses souffrant de parodontite [174]. Cependant, peu d'études ont exploré le microbiote oral total dans l'obésité. De manière intéressante, dans notre étude les deux familles Prevotellaceaceae et Tannerellaceae ont été trouvées plus abondantes, en particulier chez les femmes obèses. Ces bactéries orales activent les défenses immunitaires innées via les PAMP reconnus par les PRR des cellules de l'immunité innées. Les PAMPs sont représentés par différentes molécules de surface telles que l'acide lipoteichoïque (spécifique aux Gram-positifs) ou le LPS (spécifique aux Gram-négatifs). Les PRR comprennent un groupe de récepteurs appelés TLR [202]. Les récepteurs TLR-4 (ligand du LPS) présents dans les tissus buccaux, sont impliqués dans la réponse aux bactéries Gram-négatives orales. L'interaction entre les TLR et les PAMPs entraîne l'activation de la signalisation MyD88 et ensuite celle du facteur de transcription NF-κB. Cet état inflammatoire chronique et local pourrait favoriser l'inflammation systémique et locale du tissu adipeux par la translocation de bactéries vivantes et de métafacteurs bactériennes telles que le LPS. Les bactéries déclenchent les récepteurs TLR-4 situés à la surface des adipocytes [170,171,203,204]. En réponse à l'agression bactérienne, le profil sécrétoire des adipokines est modifié avec une diminution de l'adiponectine (adipokine anti-inflammatoire) et une augmentation de la leptine, de la résistine (adipokines pro-inflammatoires) et d'IL-6 dans les adipocytes, ce qui augmente l'état inflammatoire des tissus adipeux [27,171,205]. La translocation bactérienne dans les tissus adipeux stimule également la prolifération des pré-adipocytes et des macrophages [40].

Nous avons également constaté que les femmes obèses atteintes de parodontite étaient caractérisées par une signature spécifique de leur microbiote oral par rapport aux hommes obèses. Nos résultats montrent que les hommes obèses présentent une maladie parodontale plus sévère que les femmes obèses. Des études récentes sur des sujets exempts de maladies orales ont suggéré l'implication du genre sexuel dans la relation entre obésité et microbiote oral [178]. D'autres études confirment cette plus grande prévalence et la gravité de la parodontite plus élevée chez les hommes comparé aux femmes [206,207]. Cette maladie parodontale plus avancée est corrélée à une augmentation significative de l'abondance du genre *Neisseria* chez les hommes obèses. *Neisseria* est une bactérie Gram-négative trouvée en plus grande proportion chez les personnes obèses [186]. Une étude récente, *De Andrade et al.* a observé que le genre *Neisseria* était également influencé par le sexe chez les hommes obèses [178]. À notre connaissance, une seule étude a porté sur la composition du microbiote oral de femmes obèses souffrant de parodontite. Leurs résultats confirment les nôtres dans la mesure où ils ont également trouvé une augmentation des genres *Capnocytophaga* et *Streptococcus* [175]. Dans notre étude, les femmes obèses ont aussi tendance à avoir un état carieux plus sévère, ce qui pourrait être corrélé à l'augmentation significative du genre *Streptococcus* [208].

L'originalité de notre étude réside dans l'utilisation du séquençage ouvert à haut débit pour l'analyse du microbiote oral de patients souffrant de parodontite [209]. En effet de nombreuses études concernant des sujets atteints de parodontite réalisent une analyse microbiologique ciblée en utilisant des sondes d'ADN [210]. Un groupe limité de bactéries est alors étudié. Le séquençage à haut débit permet de dépasser les limites rencontrées avec les sondes ADN. Il permet de caractériser, sans *a priori*, l'ensemble du microbiote oral de sujets normo-pondérés et obèses souffrant de parodontite. De nouvelles associations bactériennes, même avec des espèces minoritaires, peuvent alors être observées, ce qui permet de mieux comprendre les différentes niches bactériennes et leurs interactions au sein du microbiote oral. Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation des genres *Capnocytophaga* et *Neisseria* qui ne sont pas considérés comme des pathogènes parodontaux majeurs. Néanmoins, ce sont des bactéries Gram-négatives, capables de se transloquer dans la circulation sanguine. Ces pathogènes opportunistes peuvent être associés à des parodontites mais aussi à un certain nombre de maladies infectieuses [211,212]. Le séquençage métagénomique nous a également permis de mettre en évidence des différences très marquées dans les profils microbiologiques, notamment entre les femmes obèses et les femmes normo-

pondérées, malgré le faible nombre de sujets. En effet, il sera nécessaire de confirmer et d'affiner les observations de cette étude pilote avec un échantillon plus important.

Cette étude confirme l'intérêt croissant pour la détermination du rôle du microbiote oral dans l'obésité et les différences entre les hommes et les femmes. Les patients obèses ont un risque élevé de développer des maladies parodontales. Il est donc essentiel d'informer et d'éduquer ces patients. La mise en place de mesures environnementales plus saines (activité physique, alimentation équilibrée) associées à des contrôles bucco-dentaires plus fréquents par les chirurgiens-dentistes sont à promouvoir afin de contribuer à prévenir le développement des parodontites. Par ailleurs, au sein de l'obésité, les conséquences cliniques étant différentes entre les hommes et les femmes avec une plus grande sévérité de la maladie parodontale chez les hommes, une meilleure compréhension de cette association parodontite-obésité permettra de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées pour la prévention et le traitement des patients obèses atteints de parodontite. La prise en compte du profil du patient, y compris son genre sexuel, permettra de personnaliser davantage les soins individuels.

1.5. Conclusion

En résumé, notre étude pilote a montré que le genre sexuel joue un rôle majeur dans la dysbiose du microbiote oral chez les sujets obèses. Le genre *Capnocytophaga* semble émerger dans cette signature spécifique du microbiote oral. De plus, les femmes obèses souffrant de parodontite sont caractérisées par une augmentation du genre *Streptococcus* par rapport aux hommes obèses. Ces résultats confirment l'importance que peut jouer l'obésité sur la détermination du microbiote oral en relation avec le genre sexuel, en particulier chez la femme.

Maintenant, nous nous posons la question de la causalité de cette signature du microbiote oral chez les femmes obèses dans l'aggravation de l'obésité. Afin de tester cela, nous avons transféré le microbiote oral de femmes obèses dans la cavité buccale de souris femelles.

2. RESULTATS EXPERIMENTAUX 2 :

Le transfert d’un microbiote oral dysbiotique de femmes obèses induit une maladie parodontale associée à une hypertrophie adipocytaire et à une infiltration immunitaire macrophagique dans le tissu adipeux sous-cutané chez la souris.

En cours de finalisation

2.1. Introduction :

Les causes de l'obésité sont multifactorielles et incluent le mode de vie, l'alimentation, l'environnement et certains facteurs génétiques. L'identification de ces facteurs de risque ne suffit pas pour expliquer cette pandémie, d'où la nécessité de rechercher de nouveaux paramètres. Des travaux récents suggèrent l'implication du microbiote intestinal dans le développement de l'obésité [70]. En effet, les personnes obèses sont caractérisées par un microbiote intestinal dysbiotique [213]. La dysbiose se définit par un déséquilibre à la fois qualitatif et quantitatif de la flore pouvant se traduire par une diminution de la diversité bactérienne et/ou un excès de certains pathogènes. Les patients obèses présentent une augmentation du pourcentage du phylum de *Firmicutes* (Gram-positif) et une diminution du phylum *Bactéroïdes* (Gram-négatif) [214]. Le lien de causalité entre le microbiote intestinal dysbiotique et l'obésité a été mise en évidence chez un modèle de souris par transfert de ce microbiote. Sous régime gras, des souris axéniques (dépourvues de bactéries et vivant en isolateur) colonisées avec un microbiote intestinal issu de souris obèses prennent plus de poids que celles colonisées avec un microbiote de souris normo-pondérées [70]. D'autre part, le transfert d'un microbiote dysbiotique de patients obèses dans des souris axéniques aggrave l'obésité des souris [71].

Comme dans l'intestin, le microbiote salivaire d'obèses présente un ratio *Firmicute-Bactéroïdes* augmenté comparé aux patients normo-pondérés [215]. Nous avons mis en évidence dans l'expérimentation 1, une signature du microbiote oral dysbiotique chez les femmes obèses [121]. Comme au niveau intestinal, la dysbiose salivaire peut entrainer le passage de bactéries Gram-négatives ou de facteurs de virulence à travers la muqueuse buccale. La translocation bactérienne depuis la bouche se fait via une augmentation de la perméabilité intercellulaire épithéliale induite par une inflammation chronique locale comme dans le cas de la parodontie. Comme au niveau intestinal, le passage de lipopolysaccharide (LPS) d'origine bactérienne dans le sang peut entrainer une inflammation locale et systémique de bas grade appelée endotoxémie métabolique. Cette endotoxémie associée à une réaction immuno-inflammatoire chronique peut contribuer aux désordres métaboliques. En effet, il a été montré que la translocation de LPS provenant de la cavité buccale favorisait l'aggravation ou l'émergence d'une insulino-résistance via une perturbation de la voie de signalisation à l'insuline [216]. Le LPS dans le tissu adipeux peut induire une réaction inflammatoire

chronique de bas grade par les macrophages. Cet état inflammatoire entraine la prolifération des précurseurs adipocytaires, prédisposant à l'obésité [217].

Ainsi, se pose la question de la causalité de cette signature du microbiote oral dysbiotique chez les femmes obèses, précédemment mise en évidence, sur l'aggravation de l'obésité.

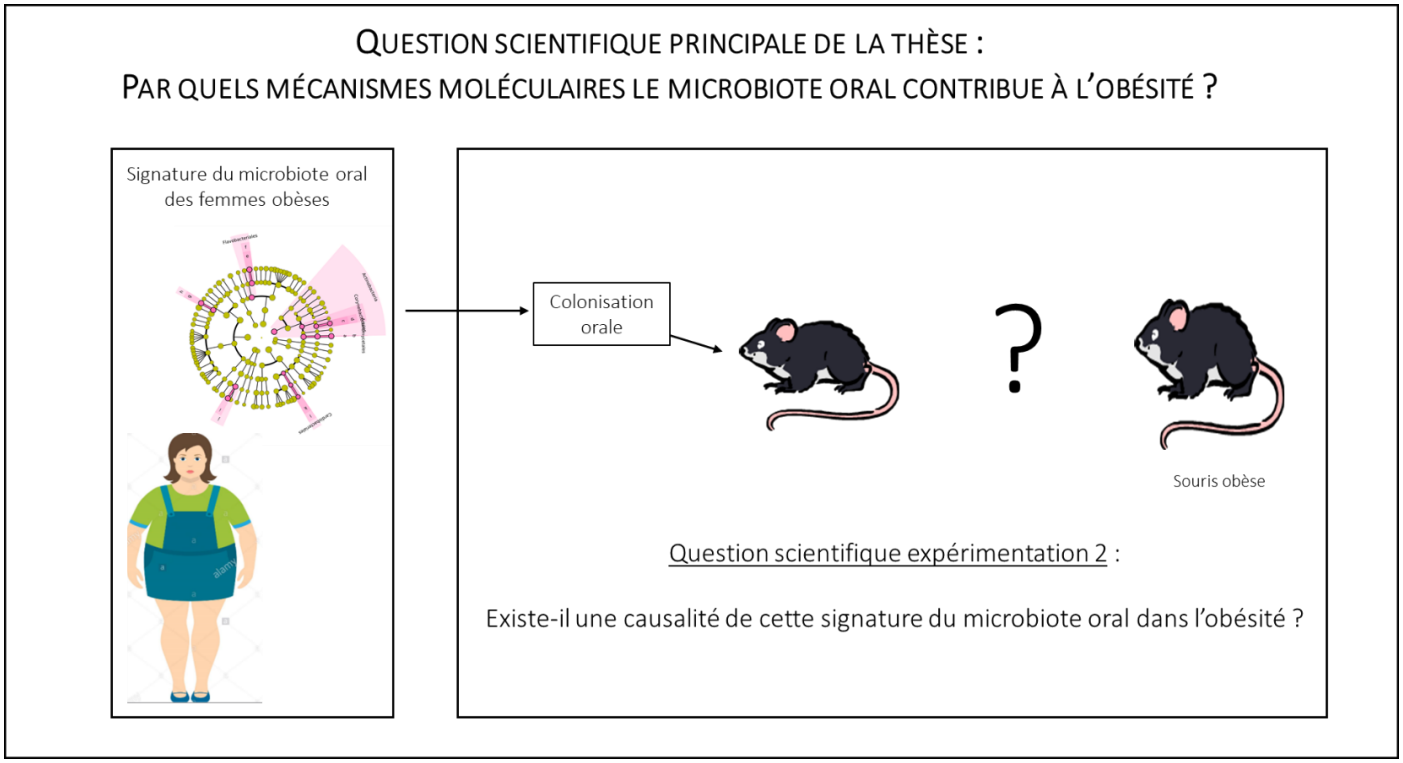


Figure 30 : Question scientifique de l'expérimentation 2

L'objectif de la partie expérimentale 2 est d'évaluer la causalité de la signature du microbiote oral de femmes obèses dans l'aggravation de l'obésité. Pour cela, nous avons transféré le microbiote salivaire vivant de femmes obèses ou normo-pondérées dans la cavité buccale de souris et étudié l'impact de ce transfert sur des paramètres immuno-inflammatoires (locaux et systémiques) et métaboliques sous régime obésogène.

2.2. Matériel et méthodes

Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité local éthique de l'Hôpital Universitaire de Rangueil (CHU de Toulouse) et de l'INSERM (APAFIS#27087-2020090315484518).

Microbiote oral :

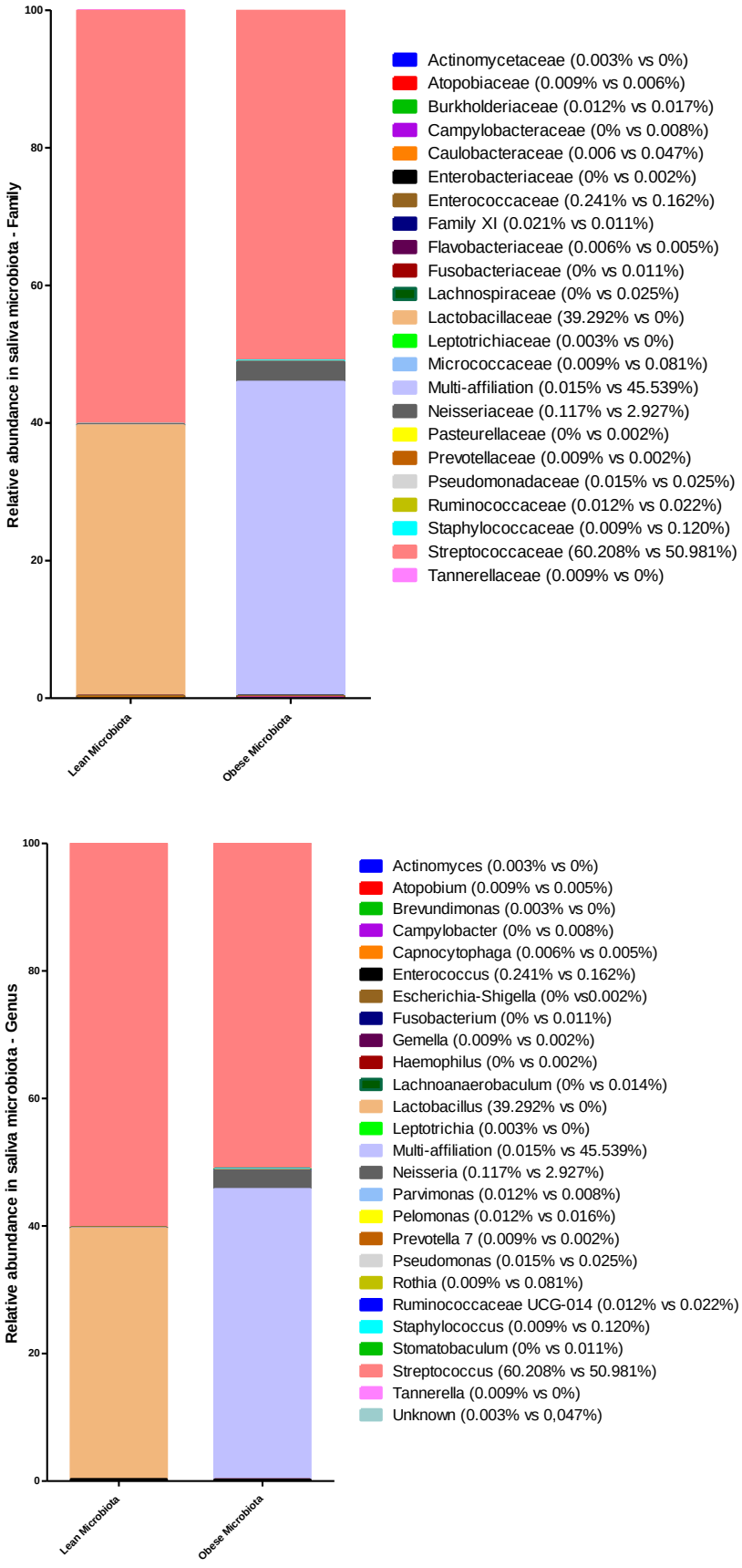
Nous avons identifié dans la partie expérimentale 1, une signature du microbiote oral chez les femmes obèses. Afin d'évaluer l'impact de ce microbiote oral dysbiotique dans l'obésité, nous avons transféré le microbiote salivaire vivant de femmes obèses ou normo-pondérées dans la cavité buccale de souris femelles. Le microbiote salivaire des femmes obèses (Obese Microbiota (OM)) utilisé pour l'expérimentation provient de la cohorte BUCCOBARIA (en cours d'investigation) qui s'intéresse à l'étude du microbiote oral et de l'état bucco-dentaire avant et après chirurgie bariatrique. Il est issu d'un pool de 2 patientes âgées de 23 et 63 ans, présentant un IMC> 35, sans comorbidité ni parodontite. Le microbiote salivaire de femmes normo-pondérées (Lean Microbiota (LM)) provient de deux donneuses âgées respectivement de 25 et 28 ans et ayant respectivement un IMC de 20,7 et 20,8. Les données générales et cliniques des différentes donneuses sont décrites dans le Tableau 6.

Pour chaque donneuse, un prélèvement de salive non stimulée a été extrait et recueilli dans des tubes stériles le jour de l'examen oral puis mis en culture sur un milieu Brucella Agar. Quarante-huit heures après, les bactéries ont été récupérées et conservées dans un bouillon Brucella glycérolé à -20°C. Pour la colonisation, les prélèvements de chaque groupe ont été mélangés dans un bouillon brucella à 37°C, renouvelé régulièrement.

Avant le début de la colonisation, une analyse taxonomique a été réalisée sur les 2 prélèvements de microbiote salivaire (LM et OM). L'ADN total a été extrait à l'aide d'un kit Qiamp Cador Pathogen Mini (QIAGEN réf 54106, Les Ulis, France) selon les recommandations du fabricant. Ensuite, les régions hypervariables V2 à V4 de l'ADN ribosomal bactérien 16S (16S rDNA) ont été analysées comme décrit précédemment [29,30]. Le séquençage Miseq des échantillons a été réalisé par Vaiomer (Labège, France). La composition taxonomique des 2 microbiotes de femmes (normo-pondérée et obèse) est décrite dans la Figure 31 (et annexe Tableau 10).

Parameters	Lean Microbiota		Obese Microbiota	
n	2		2	
General Parameters				
Sex	Female	Female	Female	Female
Age (years)	25	28	23	63
Weight (kg)	55	60	100	95
Height (cm)	163	170	155	164
BMI (kg /m^2)	20,7	20,8	41,6	35,3
Smoking	No	No	No	No
Diabetes	No	No	No	No
Medical treatment	No	No	No	No
Number of meals	3	3	3	3
Stress on a scale from 0 to 10 (EVA)	4	1	6	3
Oral Parameters				
DMF index	4	2	10	8
Number of decayed teeth	0	1	4	2
Number of missing teeth	1	0	1	4
Number of filled teeth	3	1	5	2
Plaque index (%)	1%	5%	28%	9%
Gingival bleeding Index (%)	0%	0%	0%	0%
Periodontitis	No	No	No	No
Brushing frequency	2 times a day	2 times a day	2 times a day	3 times a day
Dental check-up frequency	Once a year	Once every 2 years	Once every 2 years	Once a year
Alpha diversity				
Chao 1	19.333		22.0	
Shannon	0.708		0.845	
Simpson	0.483		0.532	

Tableau 6 : Caractéristiques générales et orales des différentes donneuses



<u>Figure 31 :</u> Composition taxonomiques des 2 transplants issus des microbiotes salivaires des 2 femmes normo-pondérées et des 2 femmes obèses

Modèle animal :

Les expériences ont été réalisées sur 54 souris femelles C57Bl/6J (Charles River, France) âgées de 8 semaines. Les animaux ont été maintenus pendant toute la durée de l'expérimentation dans un environnement contrôlé SOPF (Specific and Opportunistic Pathogen Free) à 22°C en cycle inversé jour/nuit (12h/12h), avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. A leur arrivée, tous les animaux ont été pesés, prélevés au niveau sanguin et salivaire et un recueil de fèces a été réalisé. Les souris ont ensuite été randomisées en deux groupes.

Durant 5 semaines, chaque groupe a reçu quotidiennement un traitement oral à base de gel de Carboxymethylcellulose (CMC) dans lequel est en suspension un prélèvement salivaire issu soit de femmes normo-pondérées (groupe *lean microbiota* LM) soit de femmes obèses (groupe *obese microbiota* OM). Pour cela, chaque souris a été anesthésiée (anesthésie gazeuse à l'isoflurane) et environ 200µl de gel de CMC a été déposé au niveau des bas-joues à l'aide d'une seringue.

Au bout de 5 semaines, douze souris ont été euthanasiées (6 de chaque groupe), les 42 autres animaux traités par les 2 types de microbiote ont été subdivisés aléatoirement en deux sous-groupes : l'un a reçu un régime alimentaire normal (NCD) et l'autre un régime gras (HFD) contenant 60% de lipides, 20% de protéines, 20% de glucides et des vitamines et minéraux. Elles ont ensuite été euthanasiées après 2 mois de régime. Différents organes ont été prélevés et conservés à - 80°C pour des analyses ultérieures (Figure 32).

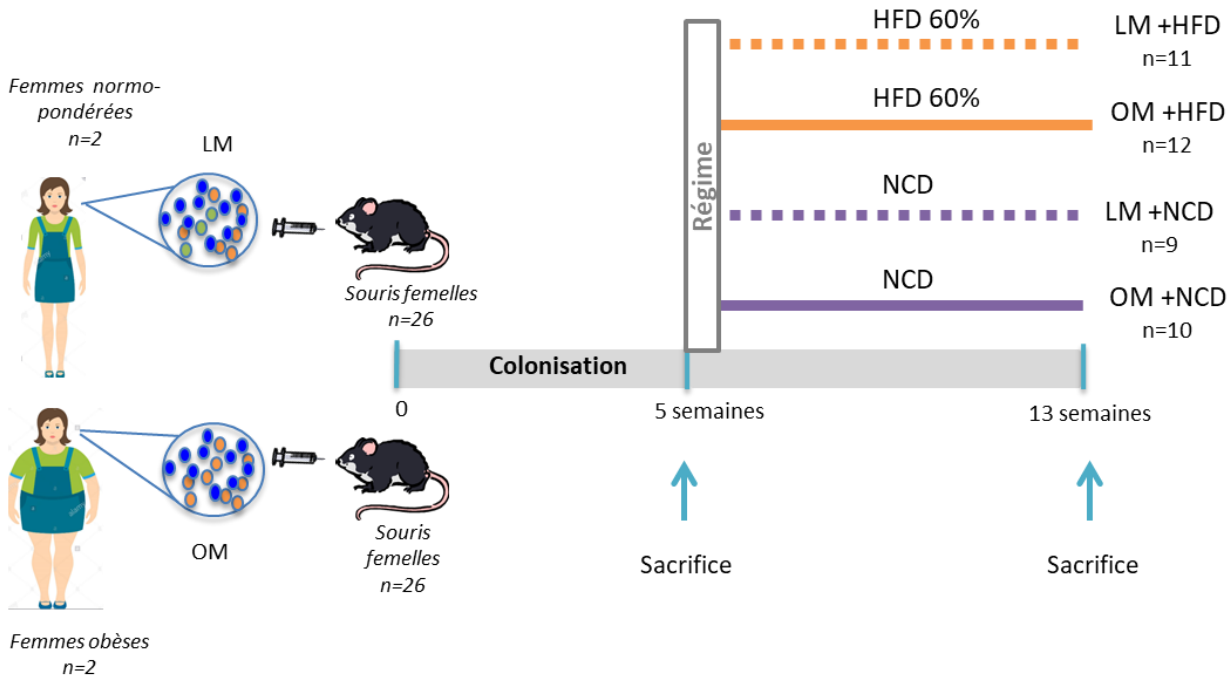


Figure 32 : Schéma explicatif du protocole

Analyses histologiques

Les hémi-mandibules gauches ont été prélevées le jour du sacrifice et fixées dans une solution de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 48h à 4°C. Elles ont ensuite été décalcifiées par électrolyse à l'aide du système décalcifiant SAKURA TDE^{TM} 30 (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Pays-Bas), déshydratées puis incluses en paraffine. Des coupes de 5µm, au niveau de la 1ère molaire mandibulaire dans le sens transversal suivant l'axe principal de la dent, ont été réalisées. Ensuite, elles ont été déparaffinées, réhydratées puis colorées à l'Hématoxyline et Eosine (H&E). Les lames ont ensuite été scannées à l'aide d'un scanner pour lames Pannoramic 250 (3D Histech, Budapest, Hongrie - plateforme GENOTOUL, Toulouse, France).

Quantification de la lyse osseuse mandibulaire

Les hémi-mandibules droites ont été prélevées le jour du sacrifice et stockées à 4°C jusqu'à l'analyse radiographique. Elles ont été scannées à l'aide d'un scanner µCT haute résolution

(EasyTom 150, plateforme Montpellier Ressource Imagerie (MRI)). Les données ont été acquises à 70 keV, avec une taille de voxel isotrope de 10 µm. Les images 3D ont été reconstruites après traitement informatique et numérisation à partir d'un ensemble de 400 coupes. La perte d'os alvéolaire en mm a été mesurée de la jonction amélo-cémentaire jusqu'à la crête de l'os alvéolaire pour les 3 molaires. Six mesures linéaires ont été obtenues pour chaque molaire (logiciel de mesure open source 3D Slicer). Un coefficient de corrélation intra classe a été réalisé afin de valider la reproductibilité de la technique de mesure. Il a été obtenu un coefficient intra-classe de 0,87.

Numération de la formule sanguine (NFS)

Chez des souris à jeun (7 heures) et anesthésiée, 30 µL de sang ont été prélevés au sinus rétro-orbitaire avec un capillaire préalablement hépariné (100 U1/mL). La numération de la formule sanguine a été obtenue avec l'analyseur sanguin ABX Micro60S (Horiba, Kyoto, Japon) dans les 2 heures suivant la prise de sang.

Cytométrie en flux

La rate et les nœuds lymphatiques cervicaux ont été prélevés après 5 semaines de colonisation et après 2 mois de régime. Ils ont été disséqués puis homogénéisés afin d'obtenir une suspension cellulaire dans du milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) contenant 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Les globules rouges spléniques ont été lysés par incubation pendant 3 minutes dans une solution hypertonique (Ammonium Chlorure Potassium (ACK)), à température ambiante. Les suspensions cellulaires ont ensuite été centrifugées (1500 rpm 10 min, 4°C) et les cellules re-suspendues dans du RPMI. Afin de bloquer les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines, les suspensions cellulaires ont été incubées dans un tampon de blocage (contenant 300µl de sérum de rat décomplémenté, 300µl de sérum de souris décomplémenté et 15µl d'un anticorps anti-CD16/CD32) pendant 20 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 minutes à 4°C en présence des anticorps spécifiques anti-MHCII (V450) au 1/600 (eBioscience, ThermoFisher scientific, Villebon-sur-Yvette, France), anti-CD45 (BV510) au 1/100 (BD), anti-TCR (PeCy7) au 1/400 (BD), anti-CD4 (APC-Cy7) au 1/400 (eBioscience ThermoFisher scientific, Villebon-sur-

Yvette, France), anti-CD3 (FITC) au 1/100 (BD Bioscience, Le pont de Claix, France), et anti-CD19 (PerCpCy5.5) au 1/200 (BD Bioscience, Le pont de Claix, France).

Les tissus adipeux sous cutanés et péri-gonadiques ont été émincés et digérés pendant 30 minutes sous agitation à 37°C dans de la Collagénase de type II (250U/ml, 5ml/TA). Les lysats sont ensuite filtrés (250µm) et repris dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant 10% de SVF afin de stopper la réaction enzymatique.

Après centrifugation (température ambiante, 1min, 10G), les adipocytes sont séparés par flottaison et récupérés pour analyse (voir paragraphe suivant).

La fraction restante est centrifugée pendant 10 minutes à 500G à température ambiante. Le culot constitué de la Fraction Stromale Vasculaire (FSV) est suspendu dans du tampon de lyse des érythrocytes, filtré (37µm) puis centrifugé (10min, 500G, température ambiante). Le culot contenant la FSV est re-suspendu dans du PBS contenant 2mM EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) et 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin). Les cellules sont marquées avec un cocktail d'anticorps en présence de Fc-block (BD Bioscience, Le pont de Claix, France) : pour les lymphocytes T : anti-CD3 (PE), anti-CD4 (FITC), anti-CD8 (APC). Pour les lymphocytes B : anti-CD19 (BV421), les macrophages et monocytes : anti-CD11b (APC-Cy7), anti-F4/80 (AF488), anti-CD11c (APC).

Les cellules marquées ont été ensuite analysées par cytométrie en flux à l'aide du cytomètre en flux LSR Fortessa™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Etats-Unis) (pour la rate et les ganglions) et du BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Etats-Unis) pour le tissu adipeux. Les données ont été traitées avec le logiciel FlowJo™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Etats-Unis) (pour la rate et les ganglions), et le logiciel BD FACS Diva™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Etats-Unis) (pour le tissu adipeux).

Analyse de la répartition du diamètre des adipocytes matures

Les adipocytes matures préalablement séparés de la FSV, ont été fixés dans une solution contenant 4% de PFA. Les suspensions adipocytaires ont ensuite été photographiées (Microscope Nikon Eclipse TE 300, Grossissement 4X). Trois images par TA ont été quantifiées. Les diamètres adipocytaires ont été mesurés à l'aide du logiciel Image J (Image j

open source software). La répartition des tailles adipocytaires a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Etats-Unis).

Dosage de l'insuline

La concentration plasmatique d'insuline a été analysée après 2 mois de régime, à l'aide d'un kit ELISA (ALPCO, Salem, USA) en suivant les instructions du fabricant.

Test de tolérance au glucose en intra-péritonéal (IPGTT)

Le test de tolérance au glucose a été réalisé après 4 semaines et 8 semaines de régime. Après un jeûne de 7 heures, une solution de glucose à 20% a été injectée par voie intra-péritonéale (1mg/g de souris). La glycémie a été mesurée à l'aide d'un glucomètre (Roche Diagnostics, Meylan, France) sur 2µl de sang prélevé au niveau de la veine caudale à -30, 0, 30, 60 et 90 minutes après l'injection.

Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes +/- l'écart standard à la moyenne (S.E.M). Les différences statistiques inter-groupe ont été mesurées en utilisant des tests non paramétriques de Mann-Withney. Un test two-way ANOVA suivi du post-test de Bonferroni a été utilisé pour l'IPGTT et la répartition du diamètre des adipocytes. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism V.5.00 pour Windows Vista (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

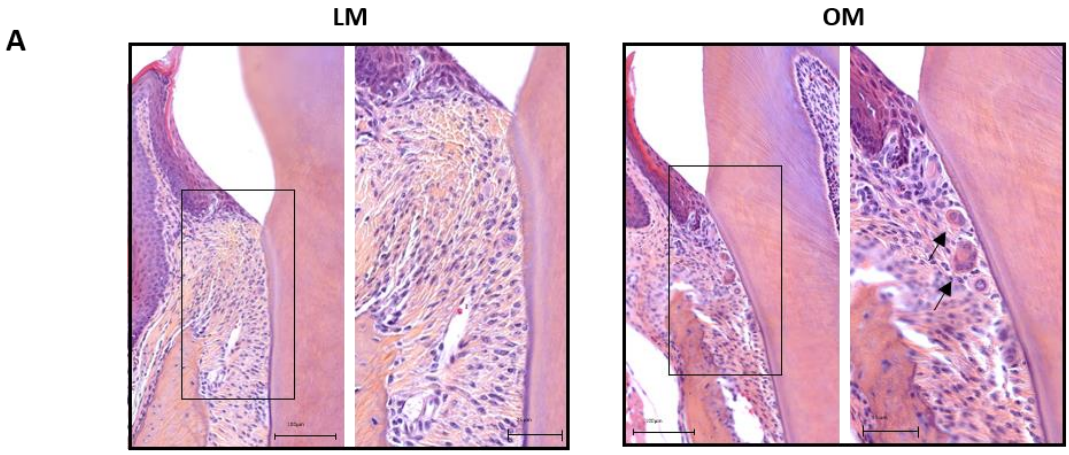
2.3. Résultats :

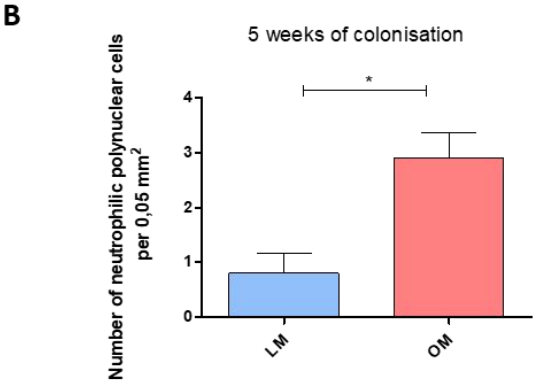
La colonisation par un microbiote salivaire d'obèses (OM) augmente le nombre de cellules immunitaires dans les tissus parodontaux et la lyse osseuse alvéolaire comparés aux souris colonisées par un microbiote salivaire de normo-pondérés (LM).

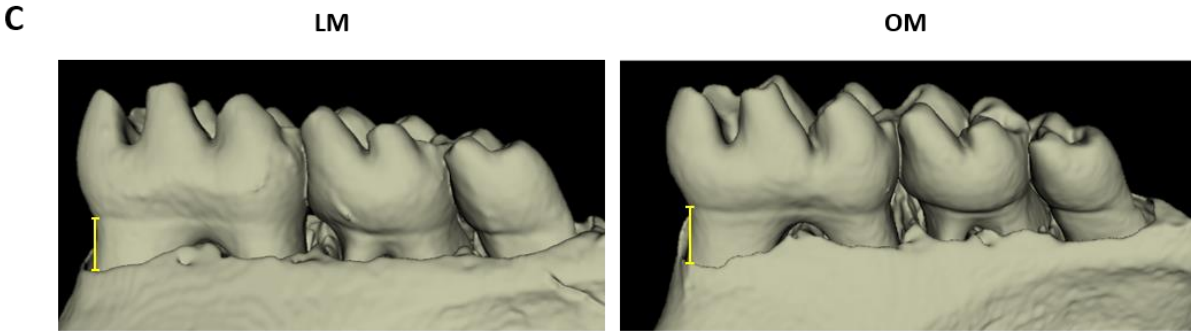
Afin d'étudier l'effet de la colonisation par OM sur la réponse immunitaire locale au niveau des tissus parodontaux (ensemble des tissus de soutien de la dent comprenant la gencive, l'os alvéolaire, le ligament alvéolaire et le cément) après 5 semaines de colonisation, nous avons analysé le nombre de cellules immunitaires par histologie et évalué la lyse osseuse alvéolaire par analyse radiographique en 3 dimensions (µCT). La coloration H&E dans les tissus parodontaux met en évidence un nombre de cellules immunitaires plus importants chez les souris colonisées par OM comparé à celles colonisées par LM (2.90/0.05mm^2± 1.00 *vs* 0.80/0.05mm^2 ± 0.83 ; p = 0.02) (Figure 33 A,B). Au niveau du premier tiers du ligament parodontal, on observe un infiltrat inflammatoire plus prononcé, une hyperacanthose et un nombre plus important de polynucléaires neutrophiles chez les souris colonisées par OM comparé à celles colonisées par LM (Figure 33 A,B). Le µCT met en évidence une lyse osseuse moyenne significativement plus importante chez les souris colonisées par OM comparé à celles colonisées par LM (0.19 mm ± 0.01 *vs* 0.16 mm ± 0.01 ; p = 0.002) (Figure 33 C et 33D).

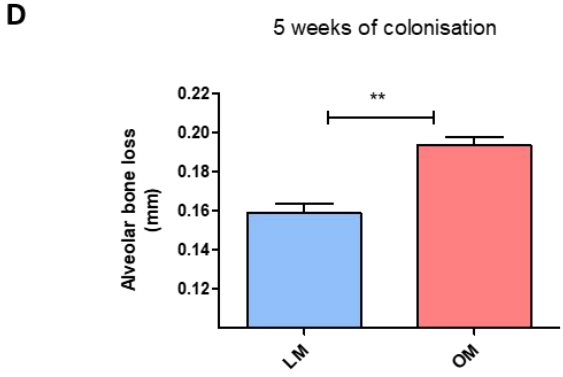
La colonisation par OM diminue le nombre total des cellules immunitaires et des lymphocytes circulants dans le sang comparé au souris colonisées par LM.

Afin d'étudier l'impact de la colonisation par OM sur la réponse immunitaire systémique, nous avons évalué la composition quantitative et qualitative des cellules immunitaires au niveau des ganglions cervicaux et au niveau sanguin après 5 semaines de colonisation. Dans les ganglions cervicaux, la colonisation par OM n'altère ni le nombre de cellules immunitaires totales (CD45+) ni le nombre de lymphocytes (CD4+, CD8+, CD19+) (Figure 33 E, F). Dans le sang, on observe un nombre inférieur de cellules immunitaires (660/mm^3 ± 342 *vs* 1133/mm^3 ± 561 ; p = 0.0008), notamment de lymphocytes totaux (592/mm^3 ± 300 *vs* 1052/mm^3 ± 488 ; p = 0.0002) après la colonisation par OM comparé au groupe colonisé par LM (Figure 33 G, H). Dans la rate aucune différence n'est observée entre les deux groupes (Figure 33 I, J).


A
LM
OM


B
5 weeks of colonisation
Number of neutrophilic polynuclear cells per 0,05 mm²
*
0
1
2
3
4
LM
OM


C
LM
OM


D
5 weeks of colonisation
Alveolar bone loss (mm)
**
0.12
0.14
0.16
0.18
0.20
0.22
LM
OM

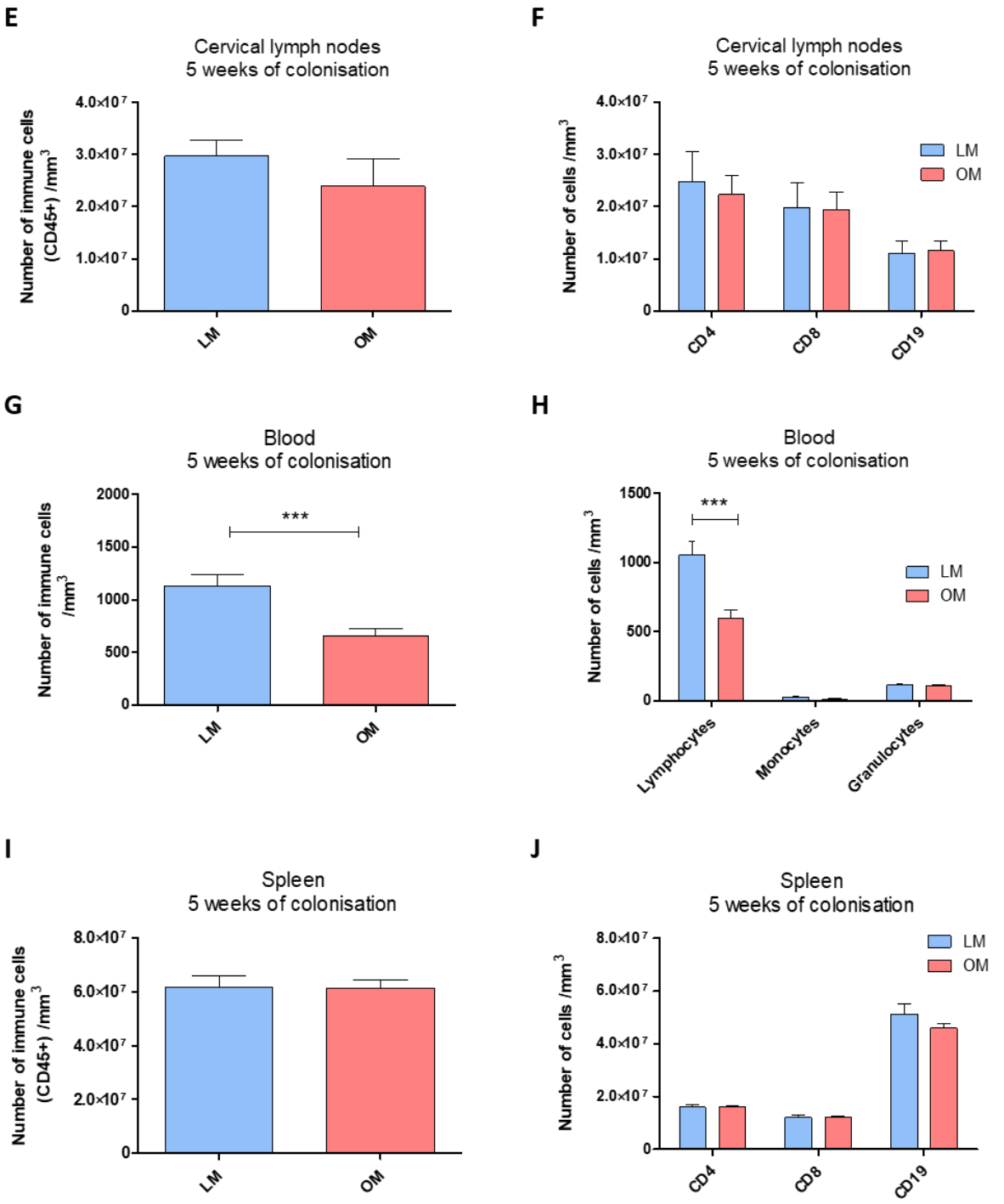


Figure 33 : Impact de la colonisation par le microbiote salivaire d'obèses sur la réponse immune au niveau local, loco-régional et systémique.
(A)Analyse histologique des hémi-mandibules colorées à l'Hématoxyline et Eosine après 5 semaines de colonisation. (B) Nombre de cellules immunitaires retrouvées sur les coupes histologiques des hémi-mandibules colorées à l'Hématoxyline et Eosine. (C).Reconstruction 3D des microCT des hémi-mandibules après 5 semaines de colonisation. (D) Lyse osseuse alvéolaire (trait jaune) correspondant à la mesure de la distance entre jonction amélo-cémentaire et la crête de l'os alvéolaire. (E) Nombre de cellules immunitaires CD45+ dans les ganglions cervicaux après 5 semaines de colonisation. (F) Nombre de cellules immunitaires dans les ganglions cervicaux après 5 semaines de colonisation. (G-H) Nombre de cellules immunitaires dans le sang après 5 semaines de colonisation. (I) Nombre de cellules immunitaires CD45+ dans la rate après 5 semaines de colonisation. (J) Nombre de cellules immunitaires dans la rate après 5 semaines de colonisation.

La colonisation par OM n'agit pas sur la prise de poids ni sur la tolérance au glucose après 2 mois de régime HFD comparé à la colonisation par LM.

Les animaux soumis au régime HFD présentent, après 2 mois, une prise de poids plus importante comparé aux animaux soumis au régime NCD. La colonisation par OM n'influe pas sur le poids des souris au cours du temps comparé à une colonisation par LM (Figure 34A). On observe également une prise de masse grasse (poids des tissus adipeux) sous cutanée et péri-gonadique significativement supérieure avec le régime HFD indépendamment du type de colonisation et sans répartition différentielle (Annexe Figure 39).

Afin d'étudier l'effet de la colonisation par OM après 2 mois de HFD sur le métabolisme glucidique, nous avons analysé la tolérance au glucose et l'insulinémie. Le régime HFD entraine une diminution de la tolérance au glucose indépendamment de la colonisation. Par contre, aucune différence sur la tolérance au glucose et l'insulinémie n'est observée quelle que soit la colonisation (Figure 34 B-D).

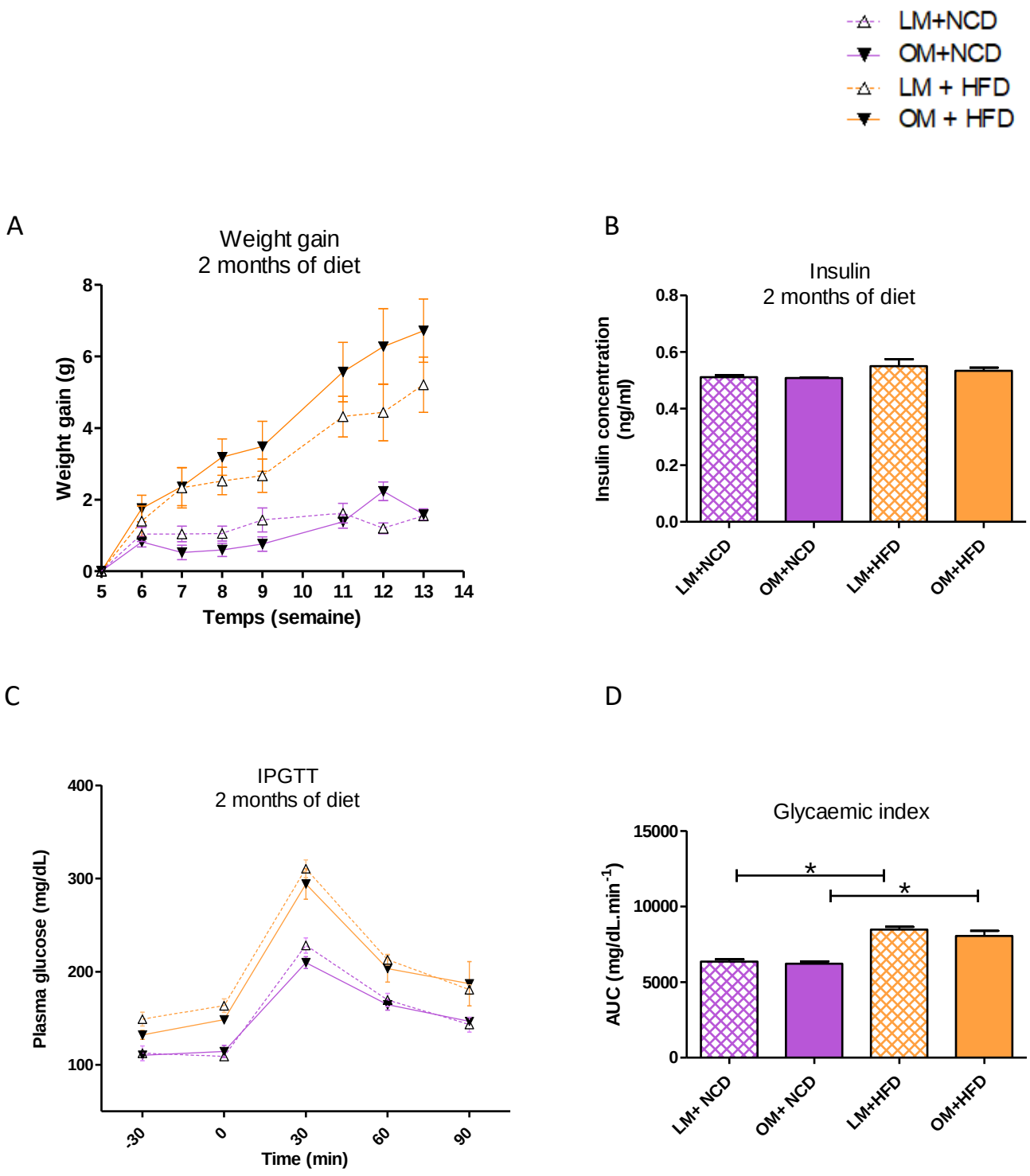


Figure 34 : Impact du transfert de microbiote salivaire d'obèses sur le plan métabolique après 2 mois de régime HFD.

(A) Prise de poids dans les différents groupes (B) Test de tolérance au glucose en intrapéritonéal après 2 mois de régime. (C) Indice glycémique issu de l'IPGTT après 2 mois de régime. (D) Concentration plasmatique d'insuline dans les différents groupes.

Après 2 mois de HFD, la colonisation par OM entraine une augmentation du nombre de cellules immunitaires dans les tissus parodontaux comparé aux souris colonisées par LM.

Nous avons observé un impact de la colonisation par OM sur la réponse immunitaire. Nous émettons l'hypothèse que cette modification immunitaire conditionne la réponse métabolique suite à la mise en place du HFD. Nous avons analysé le nombre de cellules immunitaires par histologie et évalué la lyse osseuse alvéolaire par analyse radiographique (µCT). La coloration H&E dans les tissus parodontaux met en évidence un nombre de cellules immunitaires plus importants chez les souris colonisées par OM comparé à celles colonisées par LM, après 2 mois de régime HFD ($3.50/0.05mm^2 \pm 0.87$ *vs* $1.25/0.05mm^2 \pm 0.96$; $p = 0.04$) (Figure 35 A,B). Au niveau du premier tiers du ligament parodontal, les souris colonisées par OM présentent un infiltrat inflammatoire plus prononcé et une augmentation significative de polynucléaires neutrophiles comparés aux souris colonisées par LM après 2 mois de régime HFD (Figure 35 A,B).

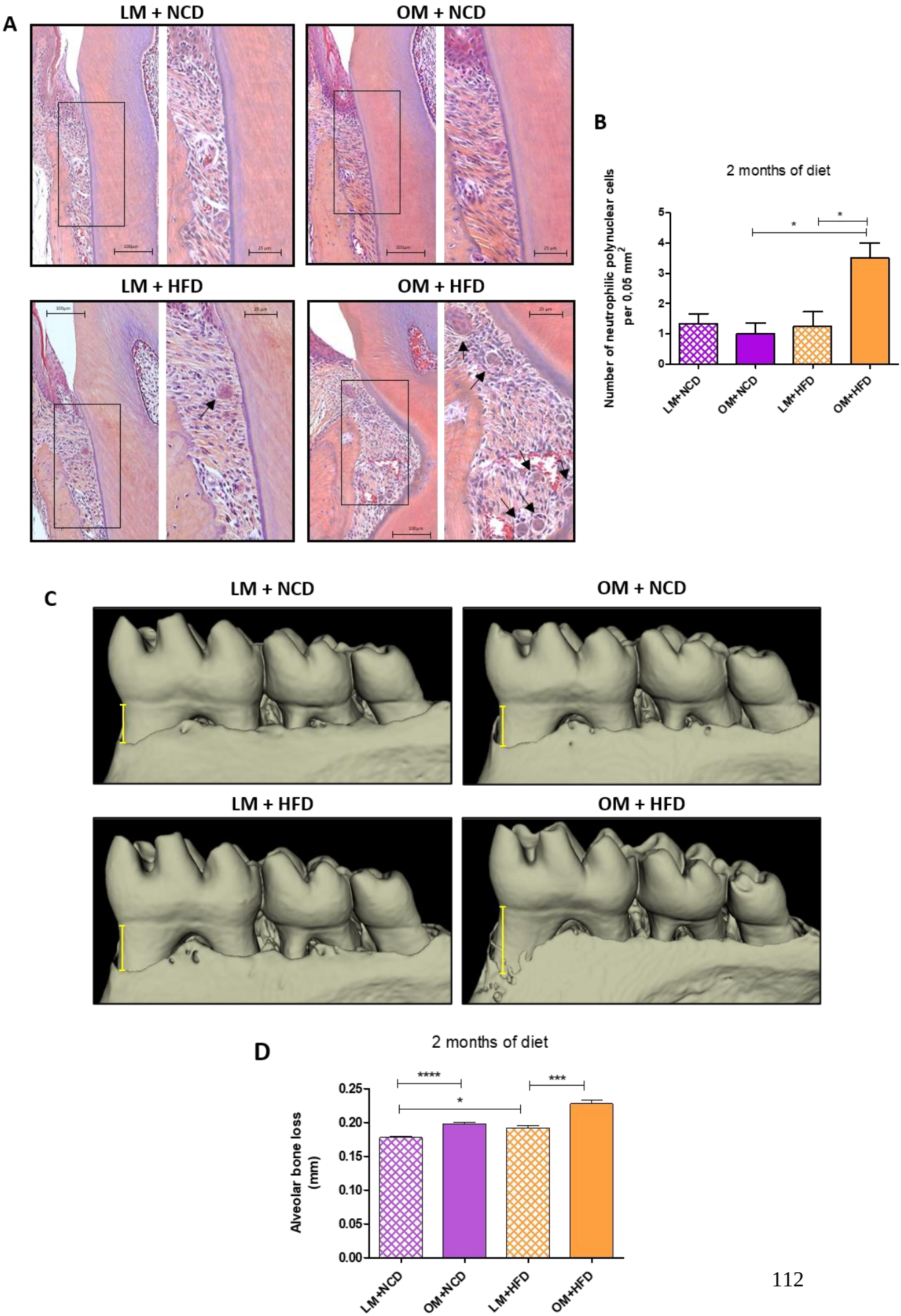
La colonisation par OM aggrave la lyse osseuse alvéolaire induite par le régime HFD.

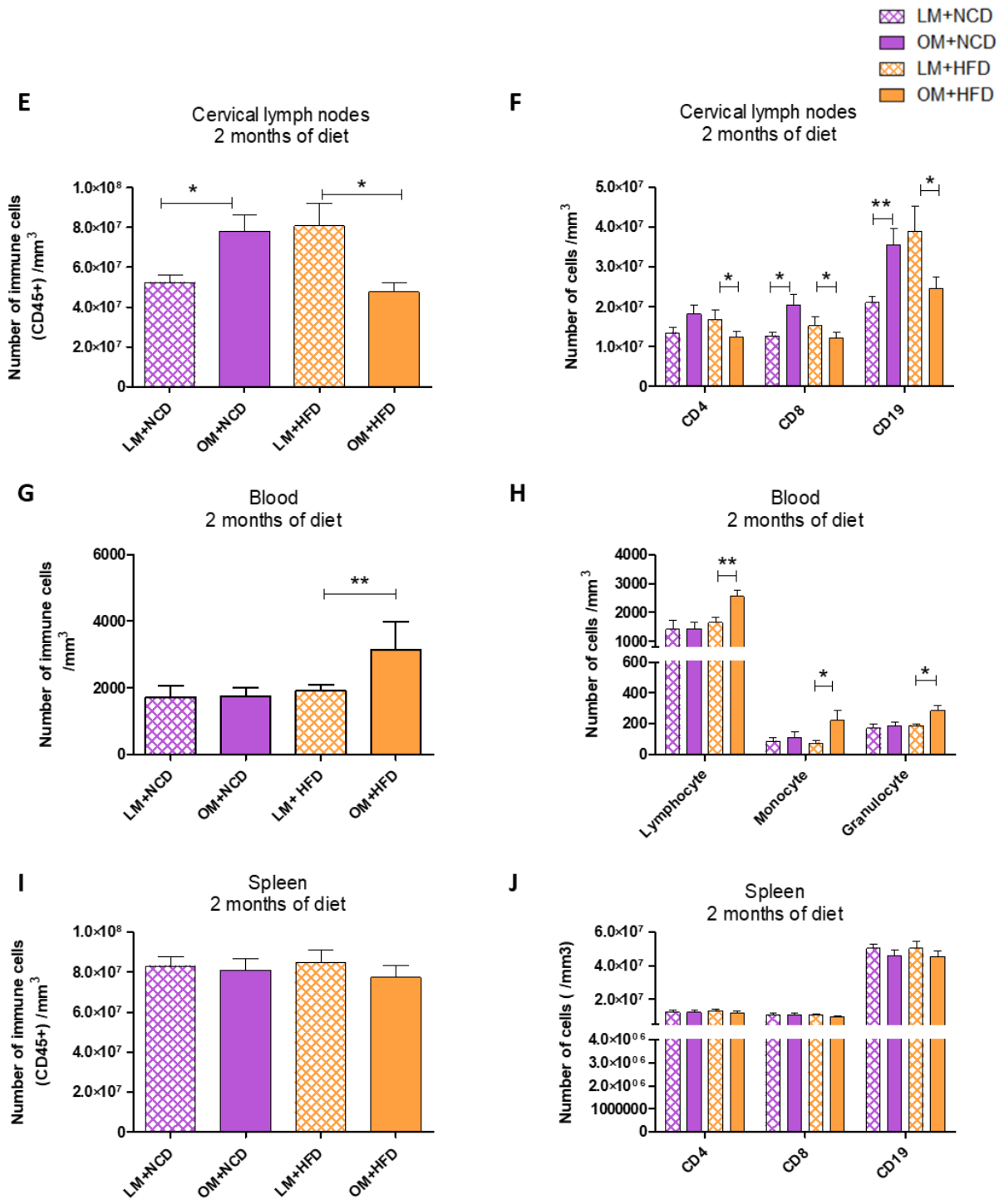
Les analyses radiographiques mettent en évidence une lyse osseuse alvéolaire significativement plus importante chez les souris colonisées par OM comparé à celles colonisées par LM après 2 mois de régime HFD (0.22 mm ± 0.01 *vs* 0.19 mm ± 0.01 ; $p = 0.0002$) et 2 mois de régime NCD (0.19 mm ± 0.007 *vs* 0.17 mm ± 0.005 ; $p = 0.0001$). De plus, chez les souris colonisées par LM, le régime HFD seul induit une augmentation significative de lyse osseuse alvéolaire (0.19 mm ± 0.01 *vs* 0.17 mm ± 0.005 ; $p = 0.01$) (Figure 35 C, D).

La colonisation par OM suivie de 2 mois de HFD réduit le recrutement de cellules immunitaires dans les ganglions cervicaux alors qu'elle augmente ce recrutement après 2 mois de régime NCD.

Nous avons évalué la composition quantitative et qualitative des cellules immunitaires au niveau loco-régional dans les ganglions cervicaux et au niveau systémique dans le sang après 2 mois de régime (NCD et HFD).

Dans les ganglions cervicaux, 2 mois de HFD augmentent le nombre de cellules immunitaires (CD45+) ($4.77e^{+07}/mm^3 \pm 1.43e^{+07}$ *vs* $8.07e^{+07}/mm^3 \pm 3.62e^{+07}$; $p = 0.02$) mais également de lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et de lymphocytes B (CD19+) chez les souris colonisées par LM. Les souris colonisées par OM, elles, ne présentent pas d'augmentation du nombre de cellules immunitaires et de lymphocytes (CD4+, CD8+ et CD19+) après 2 mois de HFD. (Figure 35 E, F). Dans le sang, par contre, les souris colonisées par OM présentent un nombre de cellules immunitaires supérieur ($3133/mm^3 \pm 852$ *vs* $1913/mm^3 \pm 519$; $p = 0.003$), notamment de lymphocytes ($2556/mm^3 \pm 587$ *vs* $1650/mm^3 \pm 475$; $p = 0.003$), monocytes ($222.2/mm^3 \pm 185.6$ *vs* $75.0/mm^3 \pm 46.3$; $p = 0.04$) et granulocytes ($375.0/mm^3 \pm 310.5$ *vs* $187.5/mm^3 \pm 35.36$; $p = 0.04$) comparé aux souris colonisées par LM après 2 mois de HFD (Figure 35 G,H). Dans la rate, nous ne retrouvons pas de différence entre les groupes (Figure 35 I, J).


A
LM + NCD
OM + NCD
LM + HFD
OM + HFD
B
2 months of diet
Number of neutrophilic polynuclear cells per 0,05 mm2
LM+NCD
OM+NCD
LM+HFD
OM+HFD
C
LM + NCD
OM + NCD
LM + HFD
OM + HFD
D
2 months of diet
Alveolar bone loss (mm)
LM+NCD
OM+NCD
LM+HFD
OM+HFD

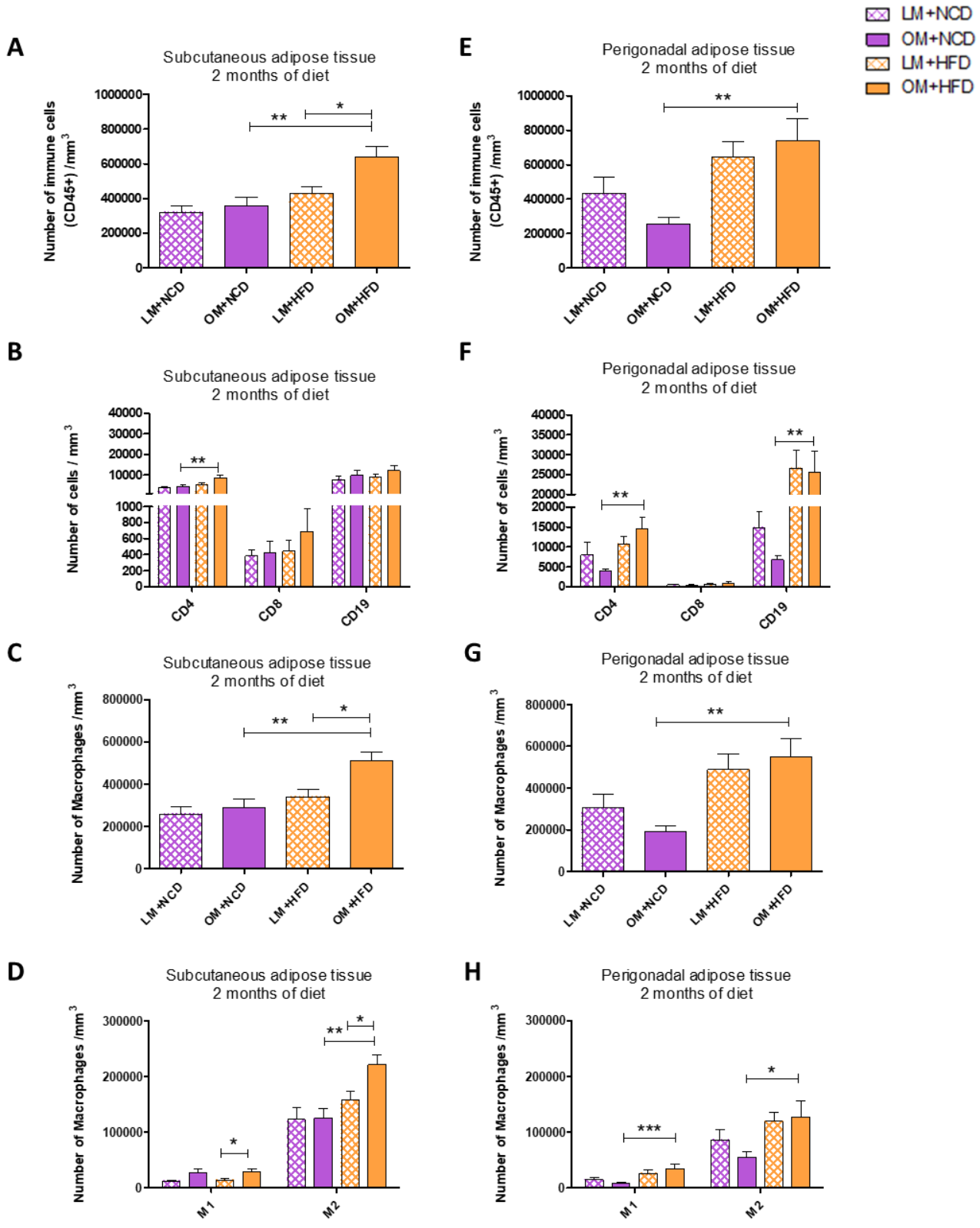


<u>Figure 35 :</u> Impact de la colonisation par le microbiote salivaire d'obèses sur la réponse immune au niveau local, loco-régional et systémique après à 2 mois de régime.
(A)Analyse histologique des hémi-mandibules colorées à l'Hématoxyline et Eosine après 2 mois de régime. (B) Nombre de cellules immunitaires retrouvées sur les coupes histologiques des hémi-mandibules colorées à l'Hématoxyline et Eosine. (C).Reconstruction 3D des microCT des hémi-mandibules après 2 mois de régime. (D) Lyse osseuse alvéolaire (trait jaune) correspondant à la mesure de la distance entre jonction amélo-cémentaire et la crête de l'os alvéolaire. (E) Nombre de cellules immunitaires CD45+ dans les ganglions cervicaux après 2 mois de régime. (F) Nombre de cellules immunitaires dans les ganglions cervicaux après 2 mois de régime. (G-H) Nombre de cellules immunitaires dans le sang après 2 mois de régime. (I) Nombre de cellules immunitaires CD45+ dans la rate après 2 mois de régime. (J) Nombre de cellules immunitaires dans la rate après 2 mois de régime.

Après 2 mois de HFD, les souris colonisées par OM présentent un recrutement plus important de cellules immunitaires et de macrophages dans le tissu adipeux sous-cutané.

L'obésité se caractérise par une inflammation chronique de bas grade du tissu adipeux. Nous avons étudié si le transfert de OM pouvait avoir un effet sur l'inflammation locale du tissu adipeux et en particulier dans les tissus sous-cutanés (Figure 36A-D) et péri-gonadiques (Figure 36E-H) après 2 mois de HFD. Pour cela, nous avons évalué la composition quantitative et qualitative des cellules immunitaires au niveau des tissus adipeux sous cutanés et péri-gonadiques après 2 mois de régime (NCD et HFD).

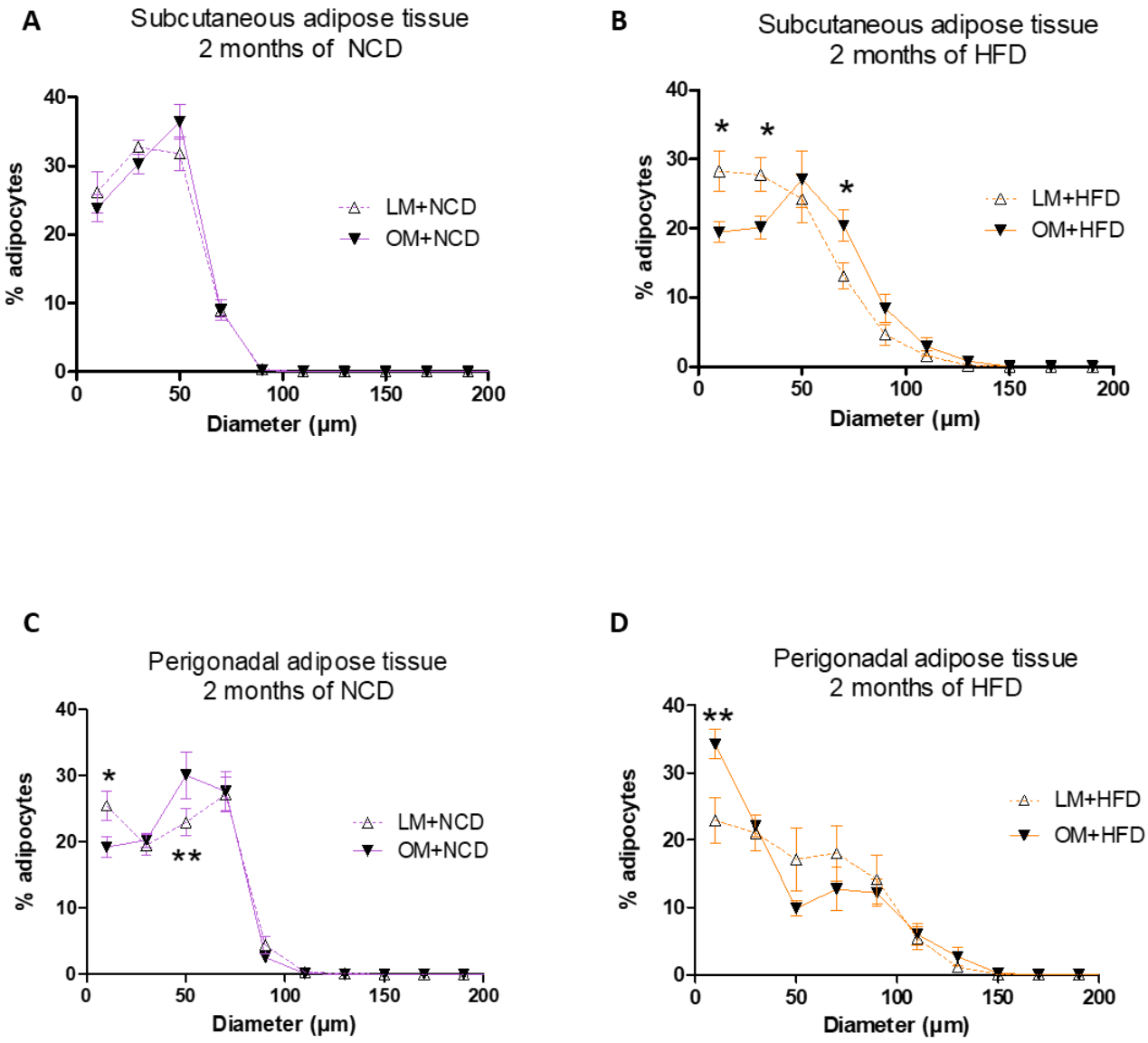
Dans le tissu adipeux sous cutané, après 2 mois de HFD, les souris préalablement colonisées par OM présentent un nombre supérieur de cellules immunitaires (CD45+) (639061/mm^3 ± 174776 *vs* 428487/mm^3 ± 115533 ; p = 0.02) associé à un plus grand nombre de macrophages (CD11b+ / F4/80) (511271/mm^3 ± 120792 *vs* 340645/mm^3 ± 99479 ; p = 0.02) comparé aux souris colonisées par LM (Figure 36 A-C). On observe un nombre plus élevé de macrophages à phénotype M1 (CD11c+CD11b+) chez les souris colonisées par OM après 2 mois de régime HFD (29711/mm^3 ± 11769 *vs* 13773/mm^3 ± 7416 ; p = 0.01). Le nombre de macrophages à phénotype M2 (CD11c-CD11b+) est quant à lui augmenté chez les souris colonisées par OM comparé aux souris colonisées par LM, après 2 mois de HFD (221879/mm^3 ± 48619 *vs* 158226/mm^3 ± 46222 ; p = 0.02) (Figure 36D). Le régime HFD entraîne une augmentation de cellules immunitaires dans le tissu adipeux péri-gonadique chez les souris colonisées par OM (Figure 36 E-H).



<u>Figure 36</u> : Impact de la colonisation par le microbiote salivaire d'obèses sur la fraction du stroma-vasculaire du tissu adipeux après 2 mois de régime.
(A) Nombre de cellules immunitaires CD45+ dans le tissu adipeux sous cutané après 2 mois de régime. (B-D) Nombres de cellules immunitaires dans le tissu adipeux sous cutané après 2 mois de régime. (E) Nombre de cellules immunitaires CD45+ dans le tissu adipeux péri-gonadique après 2 mois de régime. (F-H) Nombres de cellules immunitaires dans le tissu adipeux péri-gonadique après 2 mois de régime.

Après 2 mois de HFD, les souris colonisées par OM présentent une diminution de la fréquence des adipocytes de petite taille dans le tissu adipeux sous-cutané.

Le profil hypertrophique ou hyperplasique des tissus adipeux a été analysé par la mesure de la taille des adipocytes matures. Indépendamment de la colonisation, le régime HFD induit une augmentation de la proportion d'adipocytes matures de plus grande taille. De plus, la colonisation par OM a un impact sur la répartition de la taille adipocytaire dans le tissu adipeux sous cutané. Après 2 mois de HFD, les souris préalablement colonisées par OM présentent une diminution de la fréquence des adipocytes de petite taille (10µm et 30µm de diamètre) comparé aux souris colonisées par LM : pour les 10µm 19.46% *vs* 28.23% ; $p < 0.05$ et pour les 30µm 20.12 % *vs* 27.71% ; $p < 0.05$. De plus, après 2 mois de HFD, les souris colonisées par OM présentent une proportion plus importante d'adipocytes de diamètre 70µm comparé aux souris colonisées par LM (20.39% vs 13.09% ; $p < 0.05$). Chez les souris colonisées OM, après 2 mois de HFD, on observe un décalage de la courbe en faveur d'une augmentation de la taille adipocytaire. Ceci suggère que la colonisation par OM après 2 mois de HFD pourrait favoriser l'hypertrophie adipocytaire dans le tissu adipeux sous-cutané (Figure 37 A, B). Cependant, dans le tissu adipeux péri-gonadique, ce décalage de la courbe vers des adipocytes de plus grande taille n'est pas retrouvé (Figure 37 C, D).



<u>Figure 37 :</u> Impact de la colonisation du microbiote salivaire d'obèses sur la taille des adipocytes du tissu adipeux après 2 mois de régime.
(A-D) Répartition en pourcentage du diamètre adipocytaire (en µm) dans les tissu adipeux péri-gonadique et tissu adipeux sous cutané dans les différents groupes.

2.4. Discussion

La dysbiose orale entraine un changement organisationnel du microbiote oral pouvant potentialiser l'effet de certaines espèces ou associations bactériennes *Pg, Pi, Tf,* par exemple et, par la suite interagir avec certaines pathologies systémiques comme le diabète [173]. Il a été mis en évidence une différence dans la composition du microbiote salivaire d'obèses et de normo-pondérés, notamment, un ratio Firmicute-Bactéroides augmenté [172]. Certaines familles telles que Prevotellaceae et Peptostreptococcaceae sont en proportion plus importante dans le microbiote salivaire de personnes obèses [172]. Il a aussi été trouvé une prévalence plus élevée de *Pg* dans le microbiote oral des femmes obèses comparé aux femmes normo-pondérées [175]. Nos résultats expérimentaux 1 montrent qu'il existe une signature du microbiote oral chez les femmes obèses atteintes de parodontite [121]. Pour tester la causalité de cette signature dans l'obésité, nous avons transféré ce microbiote dans un modèle murin. Nous avons choisi de coloniser avec du microbiote salivaire provenant de patientes obèses ou normo-pondérées indemnes de pathologies parodontales et systémiques afin d'étudier l'unique effet de l'obésité sur la dysbiose du microbiote oral. Il existe des différences de composition entre nos deux groupes de microbiote avec notamment des proportions qui divergent au niveau des genres *Streptoccocus*, *Lactobacillus* et *Neisseria* entre les femmes obèses et normo-pondérées.

Pour déterminer le rôle du microbiote salivaire de personnes obèses sur les paramètres immuno-inflammatoires et métaboliques, nous avons repris un modèle de colonisation buccale validé, reproductible et développé dans l'équipe [179]. Ce modèle présente l'avantage d'étudier *in vivo* la réaction immunitaire à un microbiote salivaire spécifique d'obèses dans un organisme immunocompétent. Les résultats générés lors de cette thèse montrent que la colonisation par OM est associée à une augmentation de la lyse osseuse alvéolaire au niveau buccal ainsi qu'à une augmentation de la réaction immunitaire systémique après deux mois de régime HFD. Nous avons également montré que cette même colonisation après 2 mois de HFD a un impact spécifique sur le tissu adipeux sous cutané ; entrainant une augmentation de la réaction inflammatoire et de la taille des adipocytes. Ainsi, la colonisation par OM après 2 mois de HFD a induit une inflammation systémique aggravée.

Au niveau buccal, nos résultats mettent en évidence que la colonisation par OM entraîne une augmentation du nombre de cellules immunitaires dans les tissus parodontaux et de la lyse osseuse alvéolaire comparé aux souris colonisées par un microbiote salivaire de

normo-pondérés (LM) après 5 semaines de colonisation. Dans un deuxième temps, une partie des souris colonisées par OM et LM ont été mises sous régime HFD afin d'induire une obésité. La colonisation par OM suivie de 2 mois de régime HFD augmente la réponse immunitaire dans les tissus parodontaux et la lyse osseuse alvéolaire. Plusieurs autres études ont décrit que la mise en place d'un régime HFD dans des modèles de souris avec parodontite entraîne une augmentation de la sévérité de la maladie parodontale illustrée par l'aggravation de la perte osseuse alvéolaire [179,218–220]. Cependant, la parodontite de ces modèles de souris est obtenue soit par la pose de ligatures autours des molaires soit par l'inoculation de bactéries parodontopathogènes au niveau de la cavité buccale. Dans notre cas, le microbiote transféré provenait de patientes indemnes de parodontite. Nos résultats montrent que suite à la colonisation par OM et après 2 mois de régime HFD, des souris qui initialement avaient un état parodontal sain, présentent une atteinte parodontale plus sévère avec une lyse osseuse alvéolaire significativement plus importante que les souris colonisées par LM après 2 mois de régime HFD. Cependant on ne connait pas encore la composition exacte du microbiote installé chez les souris suite à la colonisation. Un séquençage de ce microbiote salivaire installé chez les souris colonisées permettrait d'identifier les bactéries pouvant être responsables de la réaction observée au niveau buccal. Par ailleurs, nos résultats montrent que chez les souris colonisées par LM, le régime HFD seul induit une augmentation significative de la lyse osseuse alvéolaire. Ces résultats sont comparables à ceux de *Fujita et al*. qui ont évalué l'influence de l'obésité induite par un régime HFD sur l'os alvéolaire chez des souris. Ils ont montré que les souris sous régime HFD présentaient une perturbation des fibres du ligament parodontal, une infiltration de cellules inflammatoire et une augmentation du nombre d'ostéoclastes par rapport au groupe témoin. Le régime HFD augmentait le risque de résorption osseuse et de développer une parodontite, cependant sans analyse du microbiote [221]. Dans notre travail, en plus d'avoir soumis les souris à un régime HFD, nous les avons préalablement colonisées par un microbiote d'individus obèses ou normo-pondérés. Il semblerait que cette colonisation associée à ce 2ème stress qui est le régime HFD exacerbe la réaction immunitaire buccale expliquant l'augmentation de la lyse osseuse. Il est prévu d'explorer de façon plus approfondie cette réaction immunitaire au niveau oral afin de caractériser les cellules immunitaires impliquées. Des immuno-marquages devront être effectués en ciblant les macrophages (F4/80), les lymphocytes T (CD3) et les lymphocytes B (CD20). Le remaniement osseux pourra également être évaluer en ciblant l'apoptose des ostéoclastes (marquage TUNEL par exemple) mais aussi l'activation de RANK. Il serait aussi intéressant d'évaluer l'intégrité de la barrière épithéliale suite à la colonisation. Pour cela, des

protéines des jonctions serrées comme l'occludine et la claudine seront ciblées (anti-Z01 et anti-claudine 1 par exemple). On pourra également à partir de l'extraction d'ARN des tissus parodontaux, avoir une idée de l'expression de certaines cytokines (TNF-α, IL-6 et IL-1ß) et protéines de jonction serrées (l'occludine et la claudine) par RT-PCR pour évaluer la perméabilité de la barrière épithéliale et l'inflammation locale.

Certains pathogènes oraux Gram-négatifs, tels que *Pg, Pi* et *Aa,* sont capables de disséminer et d'envahir les tissus buccaux, favorisant une inflammation systémique chronique de bas grade. En effet, les bactéries orales activent les défenses immunitaires innées via les PAMP reconnus par les PRR des cellules de l'immunité innée. Les PAMPs sont représentés par différentes molécules de surface comme l'acide lipotéichoique (spécifique des Gram-positives) ou le LPS (spécifique des Gram-négatives). Les PRRs comprennent notamment un groupe de récepteurs les TLRs [202]. Les récepteurs TLR-2 (ligand du peptidoglycane) et TLR-4 (ligand du LPS) sont retrouvés au niveau des tissus buccaux. L'interaction entre les TLRs et les PAMPs entraine l'activation de la voie de signalisation MyD88 puis du facteur de transcription NF-κB. Ce dernier est responsable de la transcription de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que TNF-α. Cet état inflammatoire chronique peut, *in fine*, intéresser l'ensemble du système immunitaire et entrainer un déséquilibre systémique [173]. A la suite de la colonisation par OM, le stress nutritionnel induit par HFD a entrainé une augmentation des cellules immunitaires au niveau sanguin mais sans effet au niveau des ganglions comparé aux souris ayant reçues le LM. La colonisation par OM, présente un premier stress pour le système immunitaire et ainsi entraine l'exacerbation de la réaction immunitaire systémique lors du 2ème stress (stress nutritionnel). Il a déjà été montré que des souris préalablement colonisées oralement par *Pg* présentent une augmentation de l'intolérance au glucose en réponse au HFD via un défaut de réaction du système immunitaire adaptatif. En effet, la stimulation au préalable du système immunitaire adaptatif par des bactéries orales prévient les désordres métaboliques induits par la colonisation sous HFD [179]. De plus *Amar et al.* rapportent que l'obésité interfère avec la capacité du système immunitaire à répondre efficacement à la colonisation par *Pg* chez des souris obèses (obésité induite par un régime) [218]. Au niveau intestinal, les désordres métaboliques impliquent également le système immunitaire adaptatif et il a été montré qu'une injection sous cutanée préalable d'extraits microbiens provenant spécifiquement de l'iléon intestinal de souris diabétiques permet de prévenir l'hyperglycémie et l'insulino-résistance chez des souris saines nourries par HFD [222].

Nos résultats mettent également en évidence que la colonisation par OM après 2 mois de HFD augmente le nombre de macrophages à phénotype M1 dans le tissu adipeux sous cutané. Cette infiltration de macrophages M1 est associée à une inflammation du tissu adipeux [32]. Le nombre de macrophages de type M1 augmente chez les souris présentant une obésité alors que celui des macrophages de type M2 reste stable [223]. L'association entre les adipocytes hypertrophiques et l'augmentation de l'infiltrat immunitaire notamment de macrophages de type M1 au niveau du tissu adipeux a été observé [37]. En effet, la sécrétion de chimiokines telle que MCP-1, également connue sous le nom de CCL2, par les adipocytes hypertrophiques et macrophages joue un rôle clé dans la migration et l'infiltration monocytaire au sein du tissu adipeux [36]. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, IL-6, IL-1ß par les adipocytes et les cellules de l'immunité favorise la multiplication de macrophages M1 pro-inflammatoires au niveau du tissu adipeux. L'augmentation de la lipolyse conduit à une libération d'acides gras qui peuvent se lier aux récepteurs TLR4 présents sur les macrophages. Cela active le facteur de transcription NF-κB et il en résulte une production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF-α, IL-6 et IL-1ß. Ainsi, une boucle paracrine impliquant les acides gras libres et TNF-α entre les adipocytes et macrophages accentue l'inflammation du tissu adipeux et contribue à son maintien [32]. D'autre part, la colonisation par OM, indépendamment du régime, induit l'augmentation des macrophages M1. L'activation du phénotype M1 peut également avoir lieu en réponse à une stimulation de type bactérienne comme le LPS [224]. Nous pouvons donc supposer une translocation de LPS ou de bactéries provenant du microbiote salivaire d'obèses au sein du tissu adipeux. Par conséquent, nous proposons de réaliser une analyse taxonomique du microbiote du tissu adipeux sous cutané [225]. En effet, les mécanismes à l'origine d'une sur-activation du système immunitaire tissulaire ne sont pas clairement identifiés. L'interaction entre l'hôte et les fragments bactériens résidant dans les tissus hôtes peut être à l'origine de cette inflammation. La translocation bactérienne au sein du tissu adipeux peut induire une stimulation de la prolifération de pré-adipocytes et de macrophages [40]. De plus, le LPS des bactéries transloquées est capable de se fixer aux complexes récepteurs CD14/TLR4 des cellules immunitaires au sein du tissu ; entrainant aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6 et IL-1ß) *via* la voie de signalisation NF-κB [40]. Le séquençage de ce microbiote tissulaire permettrait ainsi d'identifier les bactéries présentes et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ce microbiote tissulaire agit sur le fonctionnement de l'hôte. Il serait aussi intéressant de caractériser plus précisément cette

inflammation au sein du tissu adipeux sous-cutané par un dosage des cytokines sécrétées (TNF-α, IL-6, IL-1ß) et de certaines adipokines (leptine, adiponectine).

Enfin, entre les types de colonisations, nous n'observons pas de différence de phénotype d'obésité au niveau macroscopique alors que des différences ont été mises en évidence au niveau microscopique. Le fait que nous ne retrouvions pas de différence significative dans la prise de poids entre les deux groupes (OM et LM) et que celle-ci soit restée faible pourrait expliquer qu'aucun désordre concernant le métabolisme glucidique n'ait été constaté. Ainsi nous proposons de reproduire les expérimentations avec une durée de régime plus longue (4 mois par exemple). Les souris sous HFD auraient ainsi un poids plus représentatif d'une obésité et les données issues de l'analyse du tissu adipeux seraient probablement plus marquantes.

2.5. Conclusion

Nos résultats montrent que le transfert d'un microbiote oral de femmes obèses, indemnes de pathologies orales, suivi de 2 mois de régime HFD, entraine une maladie parodontale avec un infiltrat de cellules immunitaires à caractériser et une lyse osseuse alvéolaire au niveau du parodonte. Ceci est associé avec une baisse du recrutement de cellules immunitaires dans les ganglions cervicaux alors qu'il y a une activation dans le sang. Tout cela s'accompagne dans le tissu adipeux sous-cutané d'une augmentation du nombre de macrophages associée à une diminution de la fréquence d'adipocytes de faible diamètre (10 et 30µm) (Figure 38).

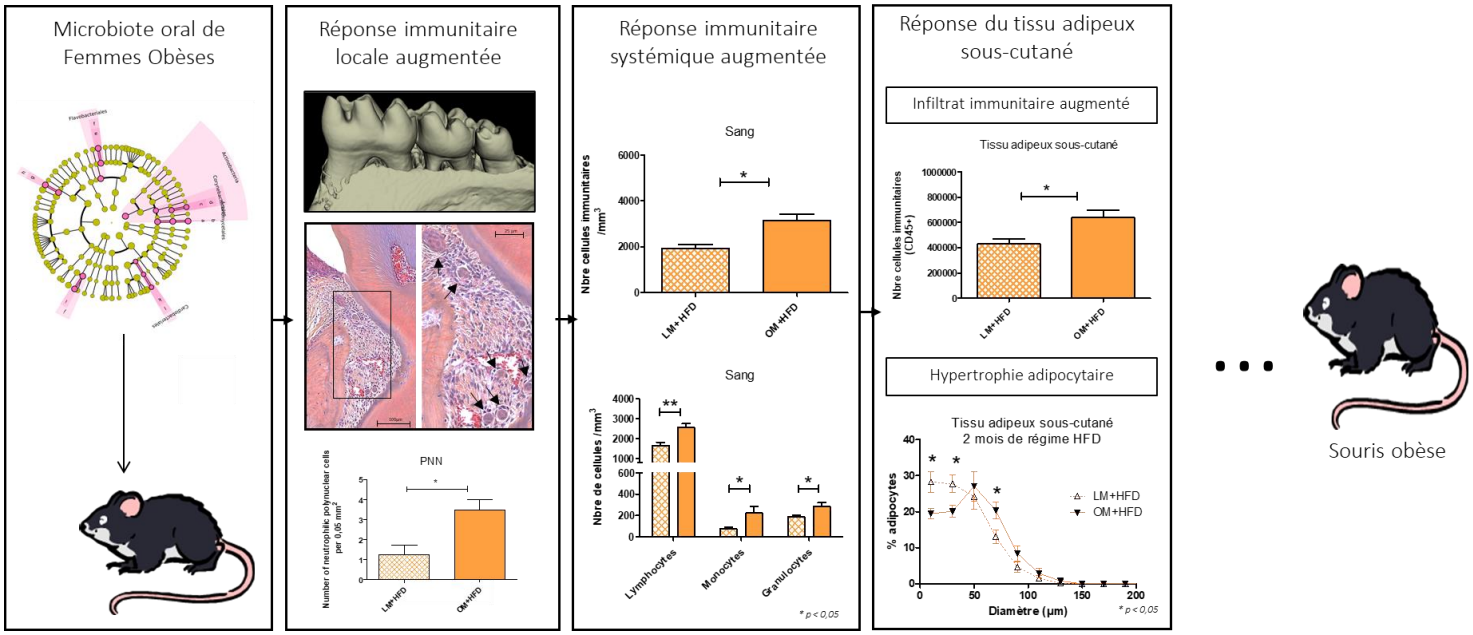


Figure 38 : Schéma de synthèse des résultats de l'expérimentation 2

Certaines interrogations restent encore en suspens :

- Quelle est la composition du microbiote oral installé chez les souris suite à la colonisation ? Un séquençage des prélèvements salivaires des souris colonisées par un microbiote oral est prévu.

- Nous avons émis l'hypothèse de la possibilité de translocation de bactéries buccales dans le tissu adipeux. Pour cela, un séquençage métagénomique 16S des tissus adipeux des souris colonisées par un microbiote oral est prévu afin d'identifier la présence ou non de bactéries dans le tissu adipeux. Si l'on met en évidence la présence de bactéries ou de méta facteurs bactériens au sein du tissu adipeux, nous pourrons comprendre par quels mécanismes l'hypertrophie et l'augmentation de l'infiltrat immunitaire précédemment mis en évidence se font. De plus, il serait intéressant de réaliser ces analyses sur les prélèvements sanguins afin de mettre en évidence ou non la présence de bactéries ou métafacteurs bactériens circulants.

- Une caractérisation plus approfondie de la réaction immuno-inflammatoire au niveau buccal (analyse immuno-histologie) et du tissu adipeux (dosage adipokines et cytokines) est aussi prévue.

IV- CONCLUSION - PERSPECTIVES

Notre travail s'est porté sur la relation entre obésité et microbiote oral. L'augmentation exponentielle de la prévalence de l'obésité ainsi que les conséquences des comorbidités associées ont amené à rechercher de nouveaux facteurs de risque comme le microbiote. Les mécanismes moléculaires en lien avec l'obésité sont complexes et encore peu connus. Ils sont d'autant plus difficiles à explorer qu'il existe une grande variabilité de phénotypes dans l'obésité comme par exemple les patients obèses dits « métaboliquement sain » ainsi que les patients obèses avec comorbidités. Ces différents phénotypes dépendent de plusieurs facteurs comme la distribution et l'expansion du tissu adipeux, la composition corporelle, la dépense énergétique, l'altération du métabolisme des macronutriments, la prédisposition génétique et l'inflammation. Il existe également une variabilité interindividuelle dans ces paramètres-là. *Pontzer et al.* ont mis en évidence qu'il existait une variation importante de l'activité métabolique (dépenses énergétiques) au cours des différentes périodes de la vie et entre les individus pouvant expliquer les différents phénotypes [226]. Pourquoi certaines personnes qui mangent énormément ne prennent quasiment aucun poids alors que d'autres sont susceptibles d'en prendre au moindre écart ? Et si finalement il existait une empreinte du microbiote qui rend certaines personnes susceptibles au surpoids et à l'obésité ? La composition de cette signature de microbiote et ses interactions avec le système immunitaire et les différents facteurs de risque (génétique et environnement) pourrait expliquer ces profils distincts et la variété interindividuelle. La caractérisation du microbiote et une meilleure compréhension de ses interactions avec l'organisme au cours de l'obésité est une piste prometteuse qui reste encore à clarifier.

En tant que chirurgien-dentiste, ce travail ouvre de nombreuses perspectives cliniques et thérapeutiques.

L'obésité a des répercussions sur la santé orale. Par exemple, des pathologies orales comme la parodontite sont plus fréquentes et plus sévères chez les personnes obèses. Inversement ces parodontites contribuent à l'inflammation systémique de bas grade présente dans l'obésité. La prise en charge conjointe de ces pathologies par la résolution de la dysbiose orale, la maîtrise de l'inflammation locale et le contrôle de la prise de poids ne peut qu'être bénéfique pour l'individu. Localement, dans la cavité buccale, l'association de thérapeutiques conventionnelles à de nouvelles thérapeutiques de modulation de la réponse de l'hôte et /ou

de la composition du microbiote pourraient permettre d'améliorer l'inflammation systémique des patients obèses et tout en participant à la prise en charge personnalisée de leur parodonte.

Nous avons obtenu en mars 2021 un avis favorable du CPP (comité de protection des personnes) pour une étude clinique PAROBIOTA (ID-RCB : 2020-A03496-33) dans laquelle je suis investigatrice et qui fait suite à notre étude pilote. Elle va permettre d'étudier la flore des patients obèses atteints de parodontite comparé aux normo-pondérés atteints de parodontite sur un plus grand échantillon. Le séquençage des microbiotes de la cohorte PAROBIOTA permettra de mettre en évidence de nouvelles cibles bactériennes et la causalité de ces potentielles nouvelles cibles bactériennes pourra être évaluée à l'aide de notre protocole de colonisation sur le modèle animal. L'identification des acteurs moléculaires et des métafacteurs du microbiote permettrait de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques associés à l'obésité. Ainsi, de nouvelles approches dans le traitement des parodontites chez les patients souffrant d'obésité pourraient être initiées. De façon plus générale, face à des patients obèses il faut prendre en considération ce facteur de risque qu'est la cavité buccale *via* son microbiote oral sur lequel nous devons agir. De quelles façons cela pourrait-il se faire ? Par exemple associer les volontés de perte de poids chez les obèses avec l'utilisation de pré- et pro-biotiques. Dans notre cohorte de patients obèses atteints de parodontite, la rééducation du microbiote oral après traitement parodontal pourra se faire à l'aide d'une recolonisation orale et parodontale guidée par l'utilisation de pré- et pro-biotiques (identifiés à partir des prélèvements salivaires et parodontaux de la cohorte). Dans la littérature, il a déjà été décrit que la recolonisation guidée des poches parodontales, associée à un traitement parodontal non chirurgical, permet de réduire l'inflammation locale et d'améliorer les résultats cliniques à long terme [227,228]. Dans notre cohorte, il serait possible d'envisager une rééducation du microbiote oral après traitement parodontal par une recolonisation avec du microbiote de personnes normo-pondérées sans pathologie orale afin de potentialiser l'installation d'un microbiote sain et de limiter la croissance de certaines espèces pathogènes persistantes. Cela pourrait se faire par exemple soit sous forme de pastilles ou de gel qui diffuseraient dans la cavité orale mais qui pourraient aussi être injectés dans les poches parodontales. Une approche préventive pourrait cibler la relation hôte-microbiote à l'aide d'un vaccin spécifique qui permettrait d'activer le système immunitaire adaptatif à la dysbiose buccale afin de permettre une réponse adéquate au 2ème agresseur qu'est le régime gras. L'injection, au préalable, d'un microbiote d'obèse sous forme inactive permettrait de préparer le système immunitaire adaptatif et de prévenir l'exacerbation de l'inflammation systémique et les désordres qu'elle peut engendrer [179]. Ces différentes

stratégies permettent de proposer des cibles thérapeutiques variées comme une bactérie entière via une utilisation de probiotiques ou comme les gènes bactériens via les métafacteurs issus du microbiote oral afin de cibler la relation hôte-microbiote et ainsi d'anticiper l'inflammation systémique.

Enfin, l'analyse du microbiote oral est simple et facile d'accès. Un microbiote oral dysbiotique et l'augmentation de certaines espèces bactériennes peuvent constituer un potentiel facteur de risque pour l'inflammation systémique et le développement de pathologies systémiques. Du fait, de notre profession, il serait intéressant de réaliser une évaluation/ un screening du microbiote oral des patients lors de notre consultation afin d'évaluer la présence ou non d'une dysbiose, sa caractérisation et son potentiel risque systémique. En effet, les données issues de l'analyse taxonomique associées aux outils de l'intelligence artificielle pourraient permettre par des algorithmes prédictifs d'associer une dysbiose spécifique à une potentielle pathologie systémique. Par exemple : une dysbiose « orange » peut être associée à un risque au diabète alors qu'une dysbiose « verte » serait associée à un risque de polyarthrite rhumatoïde et une dysbiose « bleue » à un risque d'obésité. Le screening du microbiote oral de « personnes à risque d'obésité » (prédisposition familiale, contexte socio-économique…) permettrait d'anticiper et de prévenir les conséquences d'une dysbiose installée et l'aggravation de l'inflammation systémique par exemple. Ce screening de microbiote oral pourrait représenter un biomarqueur prédictif de la survenue des pathologies générales et donc être intégré au sein d'une prise en charge pluridisciplinaire en collaboration avec les différents corps médicaux.

Pour conclure, le microbiote oral est un organisme complexe acquis dès la naissance, influencé par des facteurs environnementaux, génétiques et comportementaux. Il interagit avec les autres microbiotes de l'hôte et joue un rôle dans la santé et la maladie. Le diagnostic, le contrôle et le traitement de la dysbiose orale peut avoir un impact direct sur les maladies systémiques et orales et indirect sur la société d'un point de vue socio-économique [229,230]. Des études futures sont encore nécessaires afin d'en comprendre pleinement le lien et d'évaluer l'interaction entre la santé bucco-dentaire sur les maladies générales.

ANNEXES

Résultats expérimentaux 1

Tableau 7 : Comparaison entre l'abondance relative (%) dans le microbiote oral des sujets normo-pondérés (NWS 20<BMI<25 (n=9) et des sujets obèses (OS) BMI>30 (n=10).
*Données en moyenne ± SD, *p<0,05, **p< 0,001, ***p< 0,0001 test de Mann-Whitney non apparié.*

Relative abundance (%) in oral microbiota	Microbiota parameters	Normo-weighted subjects (NWS) 20<BMI<25 (n=9)	Obese subjects (OS) BMI>30 (n=10)	p-value
	α-diversity by the Shannon index	1.64 ±.0.80	1.81 ±.0.78	0.53
	α-diversity by the Chao 1 index	30.94 ± 14.16	32.93 ± 10.45	0.93
Phylum	Actinobacteria	9.77 ± 18.70	6.41 ± 2.83	0.15
	Bacteroidetes	15.42 ± 16.51	18.25 ± 12.66	0.83
	Epsilonbacteraeota	1.04 ± 1.21	0.70 ± 0.73	0.71
	Firmicutes	23.42 ± 14.64	29.90 ± 21.27	0.44
	Fusobacteria	6.50 ± 6.16	6.28 ± 5.88	0.90
	Patescibacteria	0.16 ± 0.34	0.12 ± 0.17	0.43
	Proteobacteria	43.41 ± 37.59	38.01 ± 32.76	0.96
	Spirochaetes	0.07 ± 0.13	0.22 ± 0.66	0.32
	Tenericutes	0.20 ± 0.41	0.09 ± 0.15	0.89
Class	Actinobacteria	9.41 ± 18.76	6.08 ± 3.01	0.27
	Alphaproteobacteria	1.83 ± 5.49	0.03 ± 0.08	0.35
	Bacilli	19.19 ± 12.64	27.55 ± 19.85	0.27
	Bacteroidia	15.42 ± 16.51	18.25 ± 12.66	0.83
	Campylobacteria	1.04 ± 1.21	0.70 ± 0.73	0.71
	Clostridia	3.95 ± 4.47	2.17 ± 2.63	0.65
	Coriobacteriia	0.36 ± 0.81	0.33 ± 0.40	0.30
	Fusobacteriia	6.50 ± 6.16	6.28 ± 5.88	0.90
	Gammaproteobacteria	41.57 ± 36.08	37.96 ± 32.75	0.96
	Gracilibacteria	0.15 ± 0.34	0.11 ± 0.16	0.42
	Mollicutes	0.20 ± 0.41	0.09 ± 0.15	0.89
	Negativicutes	0.28 ± 0.60	0.19 ± 0.21	0.71
	Spirochaetia	0.07 ± 0.13	0.22 ± 0.66	0.32
Order	Absconditabacteriales (SR1)	0.15 ± 0.34	0.11 ± 0.16	0.42
	Actinomycetales	1.14 ± 1.67	2.05 ± 2.02	0.23
	Bacillales	4.49 ± 6.89	1.99 ± 1.96	0.90
	Bacteroidales	15.06 ± 16.26	15.62 ± 11.84	0.90
	Betaproteobacteriales	34.48 ± 35.85	33.26 ± 33.83	0.84
	Campylobacterales	1.04 ± 1.21	0.70 ± 0.73	0.71
	Caulobacterales	1.63 ± 4.89	0.01 ± 0.02	0.35
	Clostridiales	3.95 ± 4.47	2.17 ± 2.63	0.65
	Coriobacteriales	0.36 ± 0.81	0.33 ± 0.40	0.30

	Corynebacteriales	0.05 ± 0.07	0.30 ± 0.43	0.17
	Flavobacteriales	0.30 ± 0.31	2.62 ± 3.20	***0.03**
	Fusobacteriales	6.50 ± 6.16	6.28 ± 5.88	0.90
	Lactobacillales	14.70 ± 10.16	25.56 ± 18.42	0.18
	Micrococcales	8.21 ± 18.56	3.72 ± 2.31	0.35
	Mycoplasmatales	0.16 ± 0.29	0.09 ± 0.15	0.89
	Pasteurellales	2.53 ± 2.65	4.59 ± 4.43	0.27
	Pseudomonadales	4.55 ± 13.59	0.04 ± 0.08	0.49
	Rhizobiales	0.20 ± 0.59	0 ± 0	0.34
	Selenomonadales	0.28 ± 0.60	0.19 ± 0.21	0.71
	Spirochaetales	0.07 ± 0.13	0.22 ± 0.66	0.32
Family	Actinomycetaceae	1.14 ± 1.67	2.05 ± 2.02	0.23
	Aerococcaceae	0.02 ± 0.04	0.61 ± 1.35	0.05
	Atopobiaceae	0.36 ± 0.81	0.31 ± 0.38	0.30
	Bacteroidaceae	0.15 ± 0.43	0 ± 0	0.34
	Burkholderiaceae	0.10 ± 0.16	0.85 ± 1.94	0.08
	Campylobacteraceae	1.03 ± 1.21	0.70 ± 0.73	0.71
	Caulobacteraceae	1.63 ± 4.89	0.01 ± 0.02	0.35
	Corynebacteriaceae	0.05 ± 0.07	0.29 ± 0.42	0.17
	Family XI	1.36 ± 1.30	2.18 ± 2.09	0.30
	Family XIII	0.67 ± 1.06	0.21 ± 0.35	0.77
	Flavobacteriaceae	0.27 ± 0.29	2.47 ± 3.02	***0.04**
	Fusobacteriaceae	4.67 ± 3.78	3.60 ± 3.94	0.77
	Lachnospiraceae	1.32 ± 1.53	0.99 ± 1.25	0.90
	Lactobacillaceae	0.37 ± 1.07	0.02 ± 0.05	0.64
	Leptotrichiaceae	1.83 ± 3.42	2.68 ± 2.71	0.23
	Micrococcaceae	8.15 ± 18.40	3.72 ± 2.31	0.35
	Moraxellaceae	4.53 ± 13.59	0.03 ± 0.08	0.86
	Multi-affiliation	1.17 ± 0.98	2.59 ± 1.79	***0.04**
	Mycoplasmataceae	0.16 ± 0.29	0.09 ± 0.15	0.89
	Neisseriaceae	34.39 ± 35.87	32.41 ± 34.11	0.96
	Pasteurellaceae	2.53 ± 2.65	4.59 ± 4.43	0.27
	Peptostreptococcaceae	0.96 ± 1.47	0.59 ± 0.92	0.77
	Porphyromonadaceae	3.99 ± 6.58	6.04 ± 5.85	0.38
	Prevotellaceae	10.13 ± 12.29	8.94 ± 9.19	0.96
	Rhizobiaceae	0.20 ± 0.59	0 ± 0	0.34
	Rikenellaceae	0.23 ± 0.58	0.04 ± 0.08	0.96
	Ruminococcaceae	0.66 ± 0.97	0.16 ± 0.20	0.30
	Spirochaetaceae	0.07 ± 0.13	0.22 ± 0.66	0.32
	Staphylococcaceae	3.35 ± 7.28	0.009 ± 0.02	0.57
	Streptococcaceae	13.14 ± 9.83	22.34 ± 17.13	0.24
	Tannerellaceae	0.22 ± 0.26	0.50 ± 1.05	0.96
	Unknown	0.24 ± 0.34	0.16 ± 0.16	0.83
	Veillonellaceae	0.28 ± 0.60	0.19 ± 0.21	0.71
Genus	*Abiotrophia*	0.02 ± 0.04	0.61 ± 1.35	0.05

	Acinetobacter	4.53 ± 13.59	0 ± 0	0.14
	Actinobacillus	0.04 ± 0.13	0.37 ± 0.69	0.18
	Actinomyces	1.14 ± 1.67	2.05 ± 2.02	0.23
	Aggregatibacter	0.14 ± 0.25	0.78 ± 1.56	0.23
	Alloprevotella	1.49 ± 2.43	0.66 ± 0.82	0.77
	Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	0.20 ± 0.59	0 ± 0	0.34
	Atopobium	0.36 ± 0.82	0.31 ± 0.38	0.30
	Bacteroides	0.15 ± 0.44	0 ± 0	0.34
	Bergeyella	0.03 ± 0.03	0.15 ± 0.24	0.18
	Brevundimonas	1.63 ± 4.89	0 ± 0	0.34
	Campylobacter	1.04 ± 1.21	0.70 ± 0.73	0.71
	Capnocytophaga	0.27 ± 0.29	2.47 ± 3.02	***0.04**
	Catonella	0.22 ± 0.26	0.09 ± 0.10	0.56
	Corynebacterium	0.05 ± 0.07	0.29 ± 0.43	0.17
	Dialister	0.28 ±0.59	0.18 ± 0.20	0.80
	F0058	0.11 ± 0.16	0.06 ± 0.09	0.70
	Filifactor	0.82 ± 1.40	0.51 ± 0.94	0.90
	Fusobacterium	4.67 ± 3.79	3.60 ± 3.94	0.77
	Gemella	1.14 ± 1.20	1.98 ± 1.97	0.20
	Haemophilus	2.35 ± 2.43	3.45 ± 3,02	0.34
	Kingella	0.06 ± 0.09	0,43 ± 0.99	0.24
	Lachnoanaerobaculum	0.27 ± 0.50	0.17 ± 0.17	0.86
	Lactobacillus	0.37 ± 1.07	0.02 ± 0.05	0.64
	Lautropia	0.08 ± 0.14	0.78 ± 1.85	0.21
	Leptotrichia	1.77 ± 3.44	2.66 ± 2.72	0.26
	Multi-affiliation	1.17 ± 0.98	2.59 ± 1.79	***0.04**
	Mycoplasma	0.16 ± 0.29	0.09 ± 0.15	0.89
	Neisseria	34.31 ± 35.90	31.90 ± 34.47	0.96
	Oribacterium	0.28 ± 0.38	0.31 ± 0.30	0.74
	Parvimonas	0.22 ± 0.26	0.20 ± 0.30	0.90
	Peptostreptococcus	0.12 ± 0.13	0.02 ±0.02	0.10
	Porphyromonas	4.00 ± 6.58	6.04 ± 5.85	0.38
	Prevotella	1.61 ± 2.02	1.46 ± 1.35	0.83
	Prevotella 2	0.08 ± 0.12	0.15 ± 0.17	0.30
	Prevotella 6	0.47 ± 0.81	0.42 ± 0.53	0.96
	"Prevotella 7"	6.23 ± 8.71	6.25 ± 7.20	0.96
	Rikenellaceae RC9 gut group	0.23 ± 0.58	0.04 ± 0.08	0.96
	Rothia	8.15 ± 18.40	3.69 ± 2.32	0.35
	Ruminococcaceae UCG-014	0.66 ± 0.97	0.16 ± 0.20	0.30
	Staphylococcus	3.35 ± 7.28	0.009 ± 0.02	0.57
	Stomatobaculum	0.43 ± 0.58	0.33 ± 0.70	0.93
	Streptococcus	13.09 ± 9.81	22.34 ± 17.13	0.24
	Tannerella	0.22 ± 0.26	0.50 ± 1.05	0.96
	Treponema 2	0.07 ± 0.13	0.22 ± 0.66	0.32
	Unknown	0.63 ± 0.72	0.25 ± 0.20	0.66
	[Eubacterium] brachy group	0.14 ± 0.30	0.05 ± 0.09	0.74
	[Eubacterium] nodatum group	0.28 ± 0.53	0.08 ± 0.13	0.64

<u>Tableau 8 :</u> Comparaison entre l'abondance relative (%) dans le microbiote oral des hommes obèses (OM) IMC>30 (n=5) et des femmes obèses (OF) IMC>30 (n=5).
*Données exprimées en moyenne ± SD, *p<0,05, **p< 0,001, ***p< 0,0001 test de Mann-Whitney non apparié.*

Relative abundance (%) in oral microbiota	Microbiota parameters	Obese males (OM) BMI>30 (n=5)	Obese females (OF) BMI>30 (n=5)	p-value
	α-diversity by the Shannon index	1.36 ± 0.89	1.26 ± 0.27	0.09
	α-diversity by the Chao 1 index	26.41 ± 11.21	39.45 ± 3.74	***0.03**
Phylum	Actinobacteria	5.59 ± 2.71	7.23 ± 2.99	0.31
	Bacteroidetes	12.35 ± 12.71	24.16 ± 10.57	0.09
	Epsilonbacteraeota	0.32 ± 0.47	1.08 ± 0.80	0.09
	Firmicutes	13.82 ± 11.71	45.98 ± 15.32	****0.007**
	Fusobacteria	4.42 ± 6.43	8.14 ± 5.27	0.29
	Patescibacteria	0.18 ± 0.23	0.07 ± 0.05	0.99
	Proteobacteria	63.31 ± 25.87	12.72 ± 12.05	****0.007**
	Spirochaetes	0 ± 0	0.45 ± 0.93	***0.02**
	Tenericutes	0.01 ± 0.02	0.18 ± 0.19	0.07
Class	Actinobacteria	5.44 ± 2.73	6.72 ± 3.46	0.42
	Bacilli	12.99 ± 11.35	42.11 ± 15.10	***0.03**
	Bacteroidia	12.35 ± 12.71	24.16 ± 10.57	0.09
	Campylobacteria	0.32 ± 0.47	1.08 ± 0.80	0.09
	Clostridia	0.82 ± 0.95	3.52 ± 3.18	0.09
	Coriobacteriia	0.15 ± 0,20	0.51 ± 0.48	0.29
	Fusobacteriia	4.42 ± 6.43	8.14 ± 5.27	0.29
	Gammaproteobacteria	63.28 ± 25.82	12.66 ± 12.09	****0.008**
	Gracilibacteria	0.17 ± 0.22	0.06 ± 0.05	0.83
	Mollicutes	0.01 ± 0.02	0.18 ± 0.19	0.06
	Negativicutes	0.02 ± 0.02	0.36 ± 0.16	***0.01**
	Spirochaetia	0 ± 0	0.45 ± 0.93	***0.02**
Order	Absconditabacteriales (SR1)	0.17 ±0.22	0.06 ± 0.05	0.83
	Actinomycetales	0.73 ± 0.62	3.38 ± 2.10	***0.05**
	Bacillales	0.92 ± 0.89	3.05 ± 2.24	0.15
	Bacteroidales	11.17 ± 11.31	20.07 ± 11.74	0.14
	Betaproteobacteriales	58.54 ± 30.30	7.99 ± 7.75	****0.008**
	Campylobacterales	0.32 ± 0.47	1.08 ± 0.80	0.09
	Cardiobacteriales	0.005 ± 0.007	0.11 ± 0.14	***0.01**
	Clostridiales	0.82 ± 0.95	3.52 ± 3.18	0.09
	Coriobacteriales	0.15 ± 0.20	0.51 ± 0.48	0.20
	Corynebacteriales	0.02 ± 0.03	0.58 ± 0.46	***0.01**
	Flavobacteriales	1.18 ± 1.57	4.07 ± 3.92	0.20
	Fusobacteriales	4.42 ± 6.43	8.14 ± 5.27	0.29
	Lactobacillales	12.07 ± 10.48	39.05 ± 14.09	***0.01**
	Micrococcales	4.69 ± 2.57	2.74 ± 1.74	0.31

	Mycoplasmatales	0.01 ± 0.02	0.18 ± 0.19	0.06
	Pasteurellales	4.64 ± 5.08	4.55 ± 4.29	0.99
	Selenomonadales	0.02 ± 0.02	0.36 ± 0.16	***0.01**
	Spirochaetales	0 ± 0	0.45 ± 0.93	***0.02**
Family	Actinomycetaceae	0.73 ± 0.62	3.38 ± 2.10	***0.05**
	Aerococcaceae	0.06 ± 0.06	1.15 ± 1.83	0.75
	Atopobiaceae	0.15 ± 0.20	0.47 ± 0.46	0.29
	Burkholderiaceae	0.34 ± 0.44	1.35 ± 2.77	0.99
	Campylobacteraceae	0.32 ± 0.47	1.08 ± 0.80	0.09
	Cardiobacteriaceae	0.01 ± 0.01	0.11 ± 0.14	***0.01**
	Corynebacteriaceae	0.02 ± 0.03	0.57 ± 0.47	***0.01**
	Family XI	0.91 ± 0.91	3.44 ± 2.24	***0.03**
	Family XIII	0.02 ± 0.03	0.39 ± 0.43	***0.01**
	Flavobacteriaceae	1.08 ±1.50	3.86 ± 3.66	0.21
	Fusobacteriaceae	2.30 ± 3.95	4.89 ± 3.89	0.21
	Lachnospiraceae	0.53 ± 0.61	1.45 ± 1.62	0.29
	Leptotrichiaceae	2.12 ± 2.74	3.25 ± 2.85	0.40
	Micrococcaceae	4.69 ± 2.57	2.74 ± 1.74	0.31
	Multi-affiliation	1.44 ± 1.00	3.74 ± 1.70	***0.03**
	Mycoplasmataceae	0.01 ± 0.02	0.18 ± 0.19	0.06
	Neisseriaceae	58.20 ± 30.47	6.63 ± 5.27	****0.008**
	Paludibacteraceae	0.007 ± 0.02	0.11 ± 0.11	***0.01**
	Pasteurellaceae	464 ± 5.08	4.55 ± 4.29	0.99
	Peptostreptococcaceae	0.15 ± 0.24	1.02 ± 1.17	0.09
	Porphyromonadaceae	6.16 ± 7.61	5.91 ± 4.35	0.83
	Prevotellaceae	4.95 ± 7.28	12.93 ± 9.87	0.14
	Rikenellaceae	0.001 ± 0.001	0.08 ± 0.11	****0.009**
	Ruminococcaceae	0.09 ± 0.19	0.22 ± 0.21	0.50
	Spirochaetaceae	0 ± 0	0.45 ± 0.93	***0.02**
	Streptococcaceae	10.55 ± 10.42	34.12 ± 14.29	***0.05**
	Tannerellaceae	0.04 ± 0.09	0.96 ± 1.40	0.06
	Unknown	0.19 ± 0.21	0.14 ± 0.12	0.99
	Veillonellaceae	0.02 ± 0.02	0.36 ± 0.16	***0.01**
	Weeksellaceae	0.10 ± 0.09	0.21 ± 0.34	0.99
Genus	*Abiotrophia*	0.06 ± 0.06	1.15 ± 1.83	0.75
	Actinobacillus	0.72 ± 0.97	0.01 ± 0.02	0.15
	Actinomyces	0.73 ± 0.62	3.38 ± 2.10	***0.05**
	Aggregatibacter	0.27 ± 0.54	1.29 ± 2.13	0.29
	Alloprevotella	0.84 ± 1.13	0.48 ± 0.41	0.67
	Atopobium	0.15 ± 0.20	0.47 ± 0.46	0.29
	Bergeyella	0.10 ± 0.09	0.21 ± 0.34	0.99
	Campylobacter	0.33 ± 0.47	1.08 ± 0.80	0.09
	Capnocytophaga	1.08 ± 1.50	3.86 ± 3.66	0.20
	Cardiobacterium	0.005 ± 0.007	0.11 ± 0.14	***0.01**
	Catonella	0.05 ± 0.09	0.13 ± 0.10	0.29

	Corynebacterium	0.02 ± 0.03	0.57 ± 0.47	***0.01**
	Dialister	0.02 ± 0.02	0.33 ± 0.15	***0.01**
	Eikenella	0.07 ± 0.09	0.11 ± 0.13	0.52
	F0058	0.007 ± 0.01	0.11 ± 0.11	***0.01**
	Filifactor	0.03 ± 0.03	0.99 ± 1.18	***0.01**
	Fusobacterium	2.30 ± 3.95	4.89 ± 3.89	0.20
	Gemella	0.91 ± 0.91	3.05 ± 2.24	0.15
	Haemophilus	3.64 ± 3.89	3.25 ± 2.31	0.99
	Kingella	0.08 ± 0.10	0.77 ± 1.37	0.20
	Lachnoanaerobaculum	0.16 ± 0.21	0.18 ± 0.14	0.83
	Lautropia	0.28 ± 0.47	1.27 ± 2.62	0.83
	Leptotrichia	2.08 ± 2.77	3.25 ± 2.85	0.40
	Moryella	0 ± 0	0.14 ± 0.24	***0.02**
	Multi-affiliation	1.44 ± 1.00	3.74 ± 1.70	***0.03**
	Mycoplasma	0.01 ± 0.02	0.18 ± 0.19	0.06
	Neisseria	58.05 ± 30.64	5.75 ± 5.03	****0.008**
	Oribacterium	0.22 ± 0.25	0.41 ± 0.34	0.67
	Parvimonas	0.006 ± 0.005	0.40 ± 0.33	***0.01**
	Porphyromonas	6.16 ± 7.61	5.91 ± 4.35	0.83
	Prevotella	0.86 ± 1.10	2.07 ± 1.40	0.14
	Prevotella 2	0.10 ± 0.19	0.19 ± 0.16	0.29
	Prevotella 6	0.13 ± 0.28	0.70 ± 0.59	0.10
	Prevotella 7	3.02 ± 5.70	9.47 ± 7.62	0.14
	Rikenellaceae RC9 gut group	0.001 ± 0.002	0.08 ± 0.11	***0.009**
	Rothia	4.65 ± 2.61	2.74 ± 1.74	0.31
	Ruminococcaceae UCG-014	0.09 ± 0.19	0.22 ± 0.21	0.50
	Stomatobaculum	0.09 ± 0.11	0.56 ± 0.98	0.39
	Streptococcus	10.55 ± 10.42	34.12 ± 14.29	***0.05**
	Tannerella	0.04 ± 0.09	0.96 ± 1.40	0.06
	Treponema 2	0 ± 0	0.45 ± 0.93	***0.02**
	Unknown	0.24 ± 0.21	0.26 ± 0.22	0.99
	Veillonella	0.001 ± 0.002	0.02 ± 0.02	****0.009**

<u>Tableau 9</u> : Comparaison entre l'abondance relative (%) dans le microbiote oral de femmes normo-pondérées (NWF) 20<BMI<25 (n=4) et de femmes obèses (OF) BMI>30 (n=5).
*Données en moyenne ± SD, *p<0,05, **p< 0,001, ***p< 0,0001 test de Mann-Whitney non apparié.*

Relative abundance (%) in oral microbiota	**Microbiota parameters**	**Normo-weighted females (NWF) 20<BMI<25 (n=4)**	**Obese females (OF) BMI>30 (n=5)**	**p-value**
	α-diversity by the Shannon index	1.47 ± 0.96	2.26 ± 0.27	0.11
	α-diversity by the Chao 1 index	31.69 ± 15.28	39.45 ± 3.74	0.55
Phylum	Actinobacteria	2.06 ± 2.03	7.23 ± 2.99	***0.03**
	Bacteroidetes	11.75 ± 16.89	24.16 ± 10.57	0.19
	Epsilonbacteraeota	0.54 ± 0.42	1.08 ± 0.80	0.55
	Firmicutes	21.67 ± 20.34	45.98 ± 15.32	0.11
	Fusobacteria	4.57 ± 3.17	8.14 ± 5.27	0.55
	Proteobacteria	58.83 ± 41.57	12.72 ± 12.05	0.28
	Spirochaetes	0.12 ± 0.20	0.45 ± 0.93	0.80
	Tenericutes	0.37 ± 0.61	0.18 ± 0.19	0.90
Class	Actinobacteria	1.95 ± 1.87	6.72 ± 3.46	0.11
	Alphaproteobacteria	4.12 ± 8.23	0.06 ± 0.11	0.53
	Bacilli	17.65 ± 15.45	42.11 ± 15.10	0.06
	Bacteroidia	11.75 ± 16.89	24.16 ± 10.57	0.19
	Campylobacteria	0.54 ± 0.43	1.08 ± 0.80	0.55
	Clostridia	3.88 ± 5.24	3.52 ± 3.18	0.90
	Coriobacteriia	0.11 ± 0.19	0.51 ± 0.48	0.11
	Fusobacteriia	4.57 ± 3.17	8.14 ± 5.27	0.55
	Gammaproteobacteria	54.72 ± 39.86	12.66 ± 12.09	0.28
	Mollicutes	0.37 ± 0.61	0.18 ± 0.19	0.90
	Negativicutes	0.14 ± 0.19	0.36 ± 0.16	0.19
	Spirochaetia	0.12 ± 0.20	0.45 ± 0.93	0.80
Order	Actinomycetales	0.49 ± 0.62	3.38 ± 2.10	***0.03**
	Bacillales	1.03 ± 0.93	3.05 ± 2.24	0.11
	Bacteroidales	11.46 ± 16.81	20.07 ± 11.74	0.55
	Betaproteobacteriales	43.60 ± 42.64	7.99 ± 7.75	0.28
	Campylobacterales	0.54 ± 0.43	1.08 ± 0.80	0.55
	Cardiobacteriales	0.004 ± 0.003	0.11 ± 0.14	***0.01**
	Caulobacterales	3.67 ±7.34	0.02 ± 0.03	0.89
	Clostridiales	3.88 ± 5.24	3.52 ± 3.18	0.90
	Coriobacteriales	0.11 ± 0.19	0.51 ± 0.48	0.11
	Corynebacteriales	0.04 ± 0.06	0.58 ± 0.46	***0.03**
	Flavobacteriales	0.24 ± 0.17	4.07 ± 3.92	***0.01**
	Fusobacteriales	4.57 ± 3.17	8.14 ± 5.27	0.55
	Lactobacillales	16.62 ± 14.59	39.05 ± 14.09	0.06
	Micrococcales	1.40 ± 1.20	2.74 ± 1.74	0.28
	Mycoplasmatales	0.27 ± 0.42	0.18 ± 0.19	0.90
	Pasteurellales	0.91 ± 1.37	4.55 ± 4.29	0.06

	Pseudomonadales	10.21 ± 20.39	0.01 ± 0.008	0.90
	Rhizobiales	0.44 ± 0.89	0 ± 0	0.37
	Selenomonadales	0.14 ± 0.19	0.36 ± 0.16	0.19
	Spirochaetales	0.12 ± 0.20	0.45 ± 0.93	0.80
Family	Acholeplasmataceae	0.10 ± 0.19	0 ± 0	0.37
	Actinomycetaceae	0.49 ± 0.62	3.38 ± 2.10	***0.03**
	Aerococcaceae	0.02 ± 0.04	1.15 ± 1.83	0.20
	Atopobiaceae	0.11 ± 0.19	0.48 ± 0.46	0.11
	Burkholderiaceae	0.03 ± 0.06	1.35 ± 2.77	0.11
	Campylobacteraceae	0.54 ± 0.43	1.08 ± 0.80	0.55
	Cardiobacteriaceae	0.004 ± 0.003	0.11 ± 0.14	***0.01**
	Caulobacteraceae	3.67 ± 7.34	0.02 ± 0.03	0.89
	Clostridiales vadinBB60 group	0.17 ± 0.33	0.01 ± 0.02	0.89
	Corynebacteriaceae	0.04 ± 0.06	0.57 ± 0.47	***0.03**
	Family XI	1.39 ± 1.13	3.44 ± 2.24	0.19
	Family XIII	0.76 ± 1.31	0.39 ± 0.43	0.73
	Flavobacteriaceae	0.22 ± 0.15	3.86 ± 3.66	***0.01**
	Fusobacteriaceae	4.19 ± 2.92	4.89 ± 3.89	0.99
	Lachnospiraceae	0.99 ± 1.17	1.45 ±1.62	0.41
	Leptotrichiaceae	0.38 ± 0.42	3.25 ± 2.85	***0.01**
	Micrococcaceae	1.39 ± 1.20	2.74 ± 1.74	0.28
	Moraxellaceae	10.20 ± 20.39	0.0006 ± 0.001	0.86
	Multi-affiliation	0.73 ± 0.52	3.74 ± 1.70	***0.01**
	Mycoplasmataceae	0.27 ± 0.42	0.18 ± 0.19	0.91
	Neisseriaceae	43.57 ± 42.67	6.63 ± 5.27	0.19
	Paludibacteraceae	0.19 ± 0.23	0.11 ± 0.11	0.90
	Pasteurellaceae	0.91 ± 1.37	4.55 ± 4.30	0.06
	Peptostreptococcaceae	1.37 ± 1.99	1.02 ± 1.17	0.99
	Porphyromonadaceae	5.13 ± 9.33	5.91 ± 4.35	0.28
	Prevotellaceae	5.09 ± 5.81	12.93 ± 9.87	0.28
	Rhizobiaceae	0.44 ± 0.89	0 ± 0	0.37
	Rikenellaceae	0.46 ± 0.88	0.08 ± 0.11	0.90
	Ruminococcaceae	0.18 ± 0.31	0.22 ± 0.21	0.90
	Spirochaetaceae	0.12 ± 0.20	0.45 ± 0.93	0.80
	Streptococcaceae	15.86 ± 14.21	34.12 ± 14.29	0.11
	Tannerellaceae	0.18 ± 0.20	0.96 ± 1.40	0.35
	Unknown	0.19 ± 0.21	0.14 ± 0.12	0.99
	Veillonellaceae	0.14 ± 0.19	0.36 ± 0.16	0.19
	Weeksellaceae	0.02 ± 0.01	0.21 ± 0.37	0.14
Genus	*Abiotrophia*	0.02 ± 0.04	1.15 ± 1.83	0.20
	Acinetobacter	10.20 ± 20.39	0 ± 0	0.37
	Actinomyces	0.49 ± 0.62	3.38 ± 2.10	***0.03**
	Aggregatibacter	0.03 ± 0.05	1.29 ± 2.13	0.10
	Alloprevotella	1.17 ± 1.84	0.48 ± 0.41	0.90
	Atopobium	0.11 ± 0.19	0.47 ± 0.46	0.11

	Bergeyella	0.02 ± 0.01	0.21 ± 0.34	0.14
	Brevundimonas	3.67 ± 7.34	0 ± 0	0.37
	Campylobacter	0.54 ± 0.43	1.08 ± 0.80	0.55
	Capnocytophaga	0.22 ± 0.15	3.86 ± 3.66	***0.01**
	Cardiobacterium	0.004 ± 0.003	0.11 ± 0.14	***0.01**
	Catonella	0.31 ± 0.27	0.13 ± 0.10	0.32
	Corynebacterium	0.04 ± 0.06	0.57 ± 0.47	***0.03**
	Dialister	0.14 ± 0.19	0.33 ± 0.15	0.19
	Eikenella	0.03 ± 0.04	0.11 ± 0.13	0.38
	F0058	0.19 ± 0.23	0.11 ± 0.11	0.90
	Filifactor	1.21 ± 1.94	0.99 ± 1.18	0.73
	Fusobacterium	4.19 ± 2.92	4.89 ± 3.89	0.99
	Gemella	1.03 ± 0.93	3.05 ± 2.24	0.11
	Haemophilus	0.87 ± 1.31	3.25 ± 2.31	0.11
	Kingella	0.05 ± 0.04	0.77 ± 1.37	0.21
	Lachnoanaerobaculum	0.18 ± 0.29	0.19 ± 0.14	0.80
	Lautropia	0.03 ± 0.06	1.27 ± 2.62	0.20
	Leptotrichia	0.26 ± 0.35	3.25 ± 2.85	***0.01**
	Moryella	0.02 ± 0.03	0.14 ± 0.24	0.53
	Multi-affiliation	0.73 ± 0.52	3.74 ± 1.70	***0.01**
	Mycoplasma	0.27 ± 0.42	0.18 ± 0.19	0.90
	Neisseria	43.50 ± 42.70	5.75 ± 5.03	0.19
	Oribacterium	0.17 ± 0.30	0.41 ± 0.34	0.46
	Parvimonas	0.37 ± 0.31	0.40 ± 0.33	0.90
	Peptostreptococcus	0.16 ± 0.14	0.02 ± 0.02	0.21
	Porphyromonas	5.13 ± 9.33	5.91 ± 4.35	0.28
	Prevotella	0.61 ± 0.53	2.07 ± 1.40	0.11
	Prevotella 2	0.07 ± 0.10	0.19 ± 0.16	0.19
	Prevotella 6	0.06 ± 0.09	0.70 ± 0.59	0.14
	Prevotella 7	2.63 ± 4.30	9.47 ± 7.62	0.19
	Rikenellaceae RC9 gut group	0.46 ± 0.88	0.08 ± 0.11	0.90
	Rothia	1.39 ± 1.20	2.74 ± 1.74	0.28
	Ruminococcaceae UCG-014	0.18 ± 0.31	0.22 ± 0.21	0.90
	Stomatobaculum	0.29 ± 0.54	0.56 ± 0.98	0.46
	Streptococcus	15.86 ± 14.21	34.12 ± 14.29	0.11
	Tannerella	0.18 ± 0.20	0.96 ± 1.40	0.32
	Treponema 2	0.12 ± 0.20	0.45 ± 0.93	0.80
	Unknown	0.82 ± 1.00	0.26 ± 0.22	0.99
	[Eubacterium] brachy group	0.23 ± 0.45	0.10 ± 0.11	0.62
	[Eubacterium] nodatum group	0.10 ± 0.19	0.15 ± 0.16	0.53
	[Eubacterium] saphenum group	0.25 ± 0.37	0.08 ± 0.16	0.68

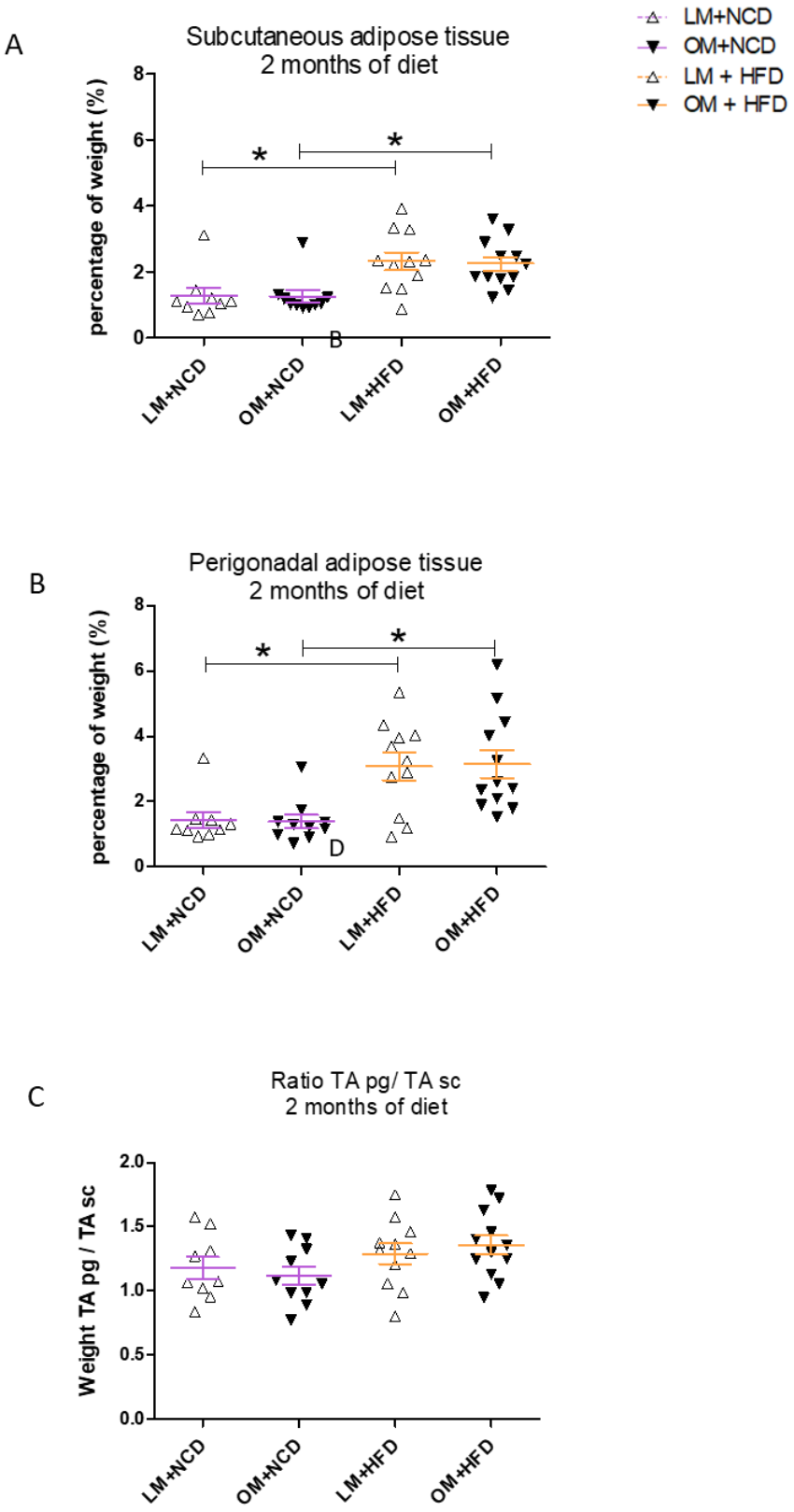
Résultats expérimentaux 2

Tableau 10 : Abondance relative (%) des 2 transplants issus du microbiote oral de femmes normo-pondérées (LM) et de femmes obèses (OM)

Relative abundance (%) in oralicrobiota	Microbiota parameters	Lean Microbiota	Obese Microbiota
Phylum	Actinobacteria	0.021	0,087
	Bacteroidetes	0.024	0,008
	Epsilonbacteraeota	0.000	0,008
	Firmicutes	99.801	96,862
	Fusobacteria	0.003	0,011
	Proteobacteria	0.151	3,022
Class	Actinobacteria	0.0121	0.081
	Alphaproteobacteria	0.006	0.048
	Bacilli	99.777	96.806
	Bacteroidia	0.024	0.008
	Campylobacteria	0.000	0.008
	Clostridia	0.024	0.056
	Coriobacteriia	0.009	0.006
	Fusobacteriia	0.003	0.011
	Gammaproteobacteria	0.145	2.975
Order	Actinomycetales	0.003	0.000
	Bacillales	0.018	0.123
	Bacteroidales	0.018	0.002
	Betaproteobacteriales	0.129	2.943
	Campylobacterales	0.000	0.008
	Caulobacterales	0.006	0.047
	Clostridiales	0.024	0.056
	Coriobacteriales	0.009	0.005
	Enterobacteriales	0.000	0.002
	Flavobacteriales	0.006	0.005
	Fusobacteriales	0.003	0.011
	Lactobacillales	99.758	96.683
	Micrococcales	0.009	0.081
	Pasteurellales	0.000	0.002
	Pseudomonadales	0.015	0.025
Family	Actinomycetaceae	0,003	0
	Atopobiaceae	0,009	0,006
	Burkholderiaceae	0,012	0,017
	Campylobacteraceae	0.000	0.008
	Caulobacteraceae	0.006	0.047
	Enterobacteriaceae	0.000	0.002
	Enterococcaceae	0.241	0.162
	Family XI	0.021	0.011
	Flavobacteriaceae	0.006	0.005
	Fusobacteriaceae	0.000	0.011
	Lachnospiraceae	0.000	0.025
	Lactobacillaceae	39.292	0.000
	Leptotrichiaceae	0.003	0.000

	Micrococcaceae	0.009	0.081
	Multi-affiliation	0.015	45.539
	Neisseriaceae	0.117	2.927
	Pasteurellaceae	0.000	0.002
	Prevotellaceae	0.009	0.002
	Pseudomonadaceae	0.015	0.025
	Ruminococcaceae	0.012	0.022
	Staphylococcaceae	0.009	0.120
	Streptococcaceae	60.208	50.981
	Tannerellaceae	0.009	0.000
Genus	*Actinomyces*	0.003	0.000
	Atopobium	0.009	0.005
	Brevundimonas	0.003	0.000
	Campylobacter	0.000	0.008
	Capnocytophaga	0.006	0.005
	Enterococcus	0.241	0.162
	Escherichia-Shigella	0.000	0.002
	Fusobacterium	0.000	0.011
	Gemella	0.009	0.002
	Haemophilus	0.000	0.002
	Lachnoanaerobaculum	0.000	0.014
	Lactobacillus	39.292	0.000
	Leptotrichia	0.003	0.000
	Multi-affiliation	0.015	45.539
	Neisseria	0.117	2.927
	Parvimonas	0.012	0.008
	Pelomonas	0.012	0.016
	Prevotella 7	0.009	0.002
	Pseudomonas	0.015	0.025
	Rothia	0.009	0.081
	Ruminococcaceae UCG-014	0.012	0.022
	Staphylococcus	0.009	0.120
	Stomatobaculum	0.000	0.011
	Streptococcus	60.208	50.981
	Tannerella	0.009	0.000
	Unknown	0.003	0.047

<u>Figure 39 :</u> Impact de la colonisation par un microbiote salivaire d'obèse sur le poids du tissu adipeux.
(A)Pourcentage par rapport au poids total de tissu adipeux sous cutané dans les différents groupes après 2 mois de régime. (B)Pourcentage par rapport au poids total de tissu adipeux péri-gonadique dans les différents groupes après 2 mois de régime (C) Ratio entre le tissu adipeux péri-gonadique et le tissu adipeux sous-cutané.



LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1 : Estimation de la prévalence de l'obésité chez les adultes au niveau mondial en 2017 [8] 17
Figure 2 : Représentation de la composition du tissu adipeux blanc [27]..... 21
Figure 3 : Lipogenèse et synthèses de triglycérides dans l'adipocyte..... 23
Figure 4 : Lipolyse dans l'adipocyte 24
Figure 5 : Facteurs à l'origine de l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité (d'après [18]modifiée)..... 28
Figure 6 : Contribution du tissu adipeux dans la mise en place des maladies cardio-métaboliques associées à l'obésité [43]. 30
Figure 7 : Principales techniques restrictives : l'anneau gastrique (schéma du haut) et la sleeve gastrectomie (schéma du bas) [56]..... 34
Figure 8 : Technique mixte : bypass gastrique [56]. 35
Figure 9 : Effets sur la perte de poids et l'amélioration des comorbidités des trois principaux types de chirurgie bariatrique [64] 36
Figure 10 : Facteurs impliqués dans l'acquisition du microbiote oral du fœtus à l'enfance et l'adolescence [97] 42
Figure 11 : Modification du microbiote au cours de la vie [109]..... 43
Figure 12 : Représentation des différentes fonctions de la salive et des différents intervenants [114] 45
Figure 13 : Les différentes étapes et application de la métagénomique par amplification de gènes conservés (=métagénomique ciblée) et de la métagénomique par séquencage de direct de l'ADN (=métagénomique globale) [119] 47
Figure 14 : LEfSe sous forme de Cladogramme représentant les différences significatives de composition bactérienne de microbiote oral entre une groupe de femmes obèses et un groupe d'hommes obèses (Thomas et al, Diagnostics 2021)[121]. 49
Figure 15 : LEfse sous forme de diagramme en barre (score LDA) représentant les caractéristiques différentielles de composition bactérienne de microbiote oral entre un groupe de femmes obèses (rose) et un groupe de femmes normo-pondérées (noir) (Thomas et al, Diagnostics 2021)[121] 50
Figure 16 : Explication des notions de richesse en espèces et de régularité (les triangles représentent les espèces bactériennes, et les différentes espèces sont présentées dans des couleurs différentes)[122]. 51
Figure 17 : Représentation schématique de la formation d'un biofilm [132] 54
Figure 18 : Colonisation du microbiote oral au niveau de l'espace supragingival et de l'espace sous-gingival sous 2 conditions distinctes : saine et pathologique [127]..... 55
Figure 19 : Exemple de caries 56
Figure 20 : Exemple de parodontite 57

Figure 21 : Relation bidirectionnelle entre le microbiote et la réaction immuno-inflammatoire de l'hôte [141] 59
Figure 22 :Mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la destruction osseuse au cours de la parodontite [132] 60
Figure 23 : Possibles mécanismes physiopathologiques liée à la translocation bactérienne (Thomas et al, Diagnostics 2021) [88] 63
Figure 24 : Question scientifique de la thèse 68
Figure 25 : Question scientifique de l'expérimentation 1 72
Figure 26 : Microbiote oral chez les sujets obèses (OS ; n = 10) par rapport aux sujets normo-pondérés (NWS ; n = 9). 80
Figure 27 : Comparaison du microbiote oral entre les hommes obèses (OM ; n= 5) et les femmes obèses (OF ; n= 5). 84
Figure 28 : Analyse en composantes principales (ACP) entre les familles bactériennes dominantes du microbiote oral et les paramètres cliniques oraux dans 4 groupes : femmes normo-pondérées (NWF ; n= 4), hommes normo-pondérés (NWM ; n = 5), femmes obèses (OF ; n = 5) et hommes obèses (OM ; n = 5). 85
Figure 29 : Comparaison du microbiote oral entre des femmes normo-pondérées (NWF ; n = 4) et des femmes obèses (OF ; n = 5). 89
Figure 30 : Question scientifique de l'expérimentation 2 96
Figure 31 : Composition taxonomiques des 2 transplants issus des microbiotes salivaires des 2 femmes normo-pondérées et des 2 femmes obèses 99
Figure 32 : Schéma explicatif du protocole 101
Figure 33 : Impact de la colonisation par le microbiote salivaire d'obèses sur la réponse immune au niveau local, loco-régional et systémique. 107
Figure 34 : Impact du transfert de microbiote salivaire d'obèses sur le plan métabolique après 2 mois de régime HFD. 109
Figure 35 : Impact de la colonisation par le microbiote salivaire d'obèses sur la réponse immune au niveau local, loco-régional et systémique après à 2 mois de régime 113
Figure 36 : Impact de la colonisation par le microbiote salivaire d'obèses sur la fraction du stroma-vasculaire du tissu adipeux après 2 mois de régime. 115
Figure 37 : Impact de la colonisation du microbiote salivaire d'obèses sur la taille des adipocytes du tissu adipeux après 2 mois de régime. 117
Figure 38 : Schéma de synthèse des résultats de l'expérimentation 2 123
Figure 39 : Impact de la colonisation par un microbiote salivaire d'obèse sur le poids du tissu adipeux. 138

Tableaux :

Tableau 1 : Seuils de corpulence en fonction de l'IMC chez l'adulte, d'après l'OMS..... 15
Tableau 2 : Fonctions, origines et variation au cours de l'obésité des principales adipokines [28] 25
Tableau 3 : Paramètres généraux et oraux entre les sujets normo-pondérés (NWS ; n = 9) et les sujets obèses (OS ; n = 10)..... 78
Tableau 4 : Comparaison des paramètres généraux et oraux entre les hommes obèses (OM ; n = 5) et les femmes obèses (OF ; n = 5)..... 82
Tableau 5 : Comparaison des paramètres généraux et oraux entre les femelles normo-pondérées (NWF ; n=4) et les femelles obèses (OF ; n=5). 87
Tableau 6 : Caractéristiques générales et orales des différentes donneuses..... 98
Tableau 7 : Comparaison entre l'abondance relative (%) dans le microbiote oral des sujets normo-pondérés (NWS 20<BMI<25 (n=9) et des sujets obèses (OS) BMI>30 (n=10). 127
Tableau 8 : Comparaison entre l'abondance relative (%) dans le microbiote oral des hommes obèses (OM) IMC>30 (n=5) et des femmes obèses (OF) IMC>30 (n=5). 130
Tableau 9 : Comparaison entre l'abondance relative (%) dans le microbiote oral de femmes normo-pondérées (NWF) 20<BMI<25 (n=4) et de femmes obèses (OF) BMI>30 (n=5). 133
Tableau 10 : Abondance relative (%) des 2 transplants issus du microbiote oral de femmes normo-pondérées (LM) et de femmes obèses (OM) 136

RÉFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation*; World Health Organization, Ed.; WHO technical report series; World Health Organization: Geneva, 2000; ISBN 978-92-4-120894-9.
2. Prentice, A.M.; Jebb, S.A. Beyond Body Mass Index. *Obes. Rev.* **2001**, *2*, 141–147, doi:10.1046/j.1467-789x.2001.00031.x.
3. Okorodudu, D.O.; Jumean, M.F.; Montori, V.M.; Romero-Corral, A.; Somers, V.K.; Erwin, P.J.; Lopez-Jimenez, F. Diagnostic Performance of Body Mass Index to Identify Obesity as Defined by Body Adiposity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Obes. 2005* **2010**, *34*, 791–799, doi:10.1038/ijo.2010.5.
4. Eschwege, E.; Charles, M.; Basdevant, A. ObEpi Enquête Epidémiologique Nationale Sur Le Surpoid et l'obésité. *Inserm Kanthar Heal. Roche* 2012.
5. Apovian, C.M. Obesity: Definition, Comorbidities, Causes, and Burden. *Am. J. Manag. CARE* **2016**, *22*, 10.
6. Chooi, Y.C.; Ding, C.; Magkos, F. The Epidemiology of Obesity. *Metabolism* **2019**, *92*, 6–10, doi:10.1016/j.metabol.2018.09.005.
7. Kelly, T.; Yang, W.; Chen, C.-S.; Reynolds, K.; He, J. Global Burden of Obesity in 2005 and Projections to 2030. *Int. J. Obes.* **2008**, *32*, 1431–1437, doi:10.1038/ijo.2008.102.
8. World Obesity Federation. Obesity Prevalence. Https:// Www.World Obesi Tydata.Org/Map/Overv Iew-Adults.
9. Goodarzi, M.O. Genetics of Obesity: What Genetic Association Studies Have Taught Us about the Biology of Obesity and Its Complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2018**, *6*, 223–236, doi:10.1016/S2213-8587(17)30200-0.
10. Nicolaidis, S. Environment and Obesity. *Metabolism.* **2019**, 5.
11. Blüher, M. Obesity: Global Epidemiology and Pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 288–298, doi:10.1038/s41574-019-0176-8.
12. WHO. Global Health Observatory, 2013. Http://Www.Who.Int.
13. Emery, C.; Dinet, J.; Lafuma, A.; Sermet, C.; Khoshnood, B.; Fagnani, F. Évaluation du coût associé à l'obésité en France. *Presse Médicale* **2007**, *36*, 832–840, doi:10.1016/j.lpm.2006.12.031.
14. Kim, D.D.; Basu, A. Estimating the Medical Care Costs of Obesity in the United States: Systematic Review, Meta-Analysis, and Empirical Analysis. *Value Health* **2016**, *19*, 602–613, doi:10.1016/j.jval.2016.02.008.
15. Spieker, E.A.; Pyzocha, N. Economic Impact of Obesity. *Prim. Care Clin. Off. Pract.* **2016**, *43*, 83–95, doi:10.1016/j.pop.2015.08.013.
16. Scheele, C.; Wolfrum, C. Brown Adipose Crosstalk in Tissue Plasticity and Human Metabolism. *Endocr. Rev.* **2019**, *41*, 53–65, doi:10.1210/endrev/bnz007.
17. White, U.A.; Tchoukalova, Y.D. Sex Dimorphism and Depot Differences in Adipose Tissue Function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 377–392, doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.006.
18. Choe, S.S.; Huh, J.Y.; Hwang, I.J.; Kim, J.I.; Kim, J.B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fendo.2016.00030.
19. Manolopoulos, K.N.; Karpe, F.; Frayn, K.N. Gluteofemoral Body Fat as a Determinant of Metabolic Health. *Int. J. Obes. 2005* **2010**, *34*, 949–959, doi:10.1038/ijo.2009.286.

20. Amati, F.; Pennant, M.; Azuma, K.; Dubé, J.J.; Toledo, F.G.S.; Rossi, A.P.; Kelley, D.E.; Goodpaster, B.H. Lower Thigh Subcutaneous and Higher Visceral Abdominal Adipose Tissue Content Both Contribute to Insulin Resistance. *Obes. Silver Spring Md* **2012**, *20*, 1115–1117, doi:10.1038/oby.2011.401.
21. Karpe, F.; Pinnick, K.E. Biology of Upper-Body and Lower-Body Adipose Tissue--Link to Whole-Body Phenotypes. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 90–100, doi:10.1038/nrendo.2014.185.
22. Porter, S.A.; Massaro, J.M.; Hoffmann, U.; Vasan, R.S.; O'Donnel, C.J.; Fox, C.S. Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue: A Protective Fat Depot? *Diabetes Care* **2009**, *32*, 1068–1075, doi:10.2337/dc08-2280.
23. Palmer, B.F.; Clegg, D.J. The Sexual Dimorphism of Obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *402*, 113–119, doi:10.1016/j.mce.2014.11.029.
24. Bastard, J.-P.; Fève, B. *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux*; Springer: Paris Berlin Heidelberg [etc.], 2012; ISBN 978-2-8178-0331-9.
25. Ley, C.J.; Lees, B.; Stevenson, J.C. Sex- and Menopause-Associated Changes in Body-Fat Distribution. *Am. J. Clin. Nutr.* **1992**, *55*, 950–954, doi:10.1093/ajcn/55.5.950.
26. Shi, H.; Clegg, D.J. Sex Differences in the Regulation of Body Weight. *Physiol. Behav.* **2009**, *97*, 199–204, doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.017.
27. Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugus, J.J.; Walsh, K. Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 85–97, doi:10.1038/nri2921.
28. Badimon, L.; Oñate, B.; Vilahur, G. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed.* **2015**, *68*, 599–611, doi:10.1016/j.rec.2015.02.025.
29. Spalding, K.L.; Arner, E.; Westermark, P.O.; Bernard, S.; Buchholz, B.A.; Bergmann, O.; Blomqvist, L.; Hoffstedt, J.; Näslund, E.; Britton, T.; et al. Dynamics of Fat Cell Turnover in Humans. *Nature* **2008**, *453*, 783–787, doi:10.1038/nature06902.
30. Reilly, S.M.; Saltiel, A.R. Adapting to Obesity with Adipose Tissue Inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 633–643, doi:10.1038/nrendo.2017.90.
31. Longo, M.; Zatterale, F.; Naderi, J.; Parrillo, L.; Formisano, P.; Raciti, G.A.; Beguinot, F.; Miele, C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2358, doi:10.3390/ijms20092358.
32. Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W. Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1796–1808, doi:10.1172/JCI19246.
33. Lee, Y.S.; Kim, J.-W.; Osborne, O.; Oh, D.Y.; Sasik, R.; Schenk, S.; Chen, A.; Chung, H.; Murphy, A.; Watkins, S.M.; et al. Increased Adipocyte O2 Consumption Triggers HIF-1α, Causing Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Cell* **2014**, *157*, 1339–1352, doi:10.1016/j.cell.2014.05.012.
34. Pasarica, M.; Sereda, O.R.; Redman, L.M.; Albarado, D.C.; Hymel, D.T.; Roan, L.E.; Rood, J.C.; Burk, D.H.; Smith, S.R. Reduced Adipose Tissue Oxygenation in Human Obesity: Evidence for Rarefaction, Macrophage Chemotaxis, and Inflammation without an Angiogenic Response. *Diabetes* **2009**, *58*, 718–725, doi:10.2337/db08-1098.
35. Wang, B.; Wood, I.S.; Trayhurn, P. Dysregulation of the Expression and Secretion of Inflammation-Related Adipokines by Hypoxia in Human Adipocytes. *Pflugers Arch.* **2007**, *455*, 479–492, doi:10.1007/s00424-007-0301-8.
36. Kanda, H.; Tateya, S.; Tamori, Y.; Kotani, K.; Hiasa, K.; Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; Miyachi, H.; Maeda, S.; Egashira, K.; et al. MCP-1 Contributes to Macrophage Infiltration into Adipose Tissue, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Obesity. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1494–1505, doi:10.1172/JCI26498.

37. Verboven, K.; Wouters, K.; Gaens, K.; Hansen, D.; Bijnen, M.; Wetzels, S.; Stehouwer, C.D.; Goossens, G.H.; Schalkwijk, C.G.; Blaak, E.E.; et al. Abdominal Subcutaneous and Visceral Adipocyte Size, Lipolysis and Inflammation Relate to Insulin Resistance in Male Obese Humans. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4677, doi:10.1038/s41598-018-22962-x.
38. Castoldi, A.; Naffah de Souza, C.; Câmara, N.O.S.; Moraes-Vieira, P.M. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front. Immunol.* **2016**, *6*, doi:10.3389/fimmu.2015.00637.
39. McArdle, M.A.; Finucane, O.M.; Connaughton, R.M.; McMorrow, A.M.; Roche, H.M. Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies. *Front. Endocrinol.* **2013**, *4*, 52, doi:10.3389/fendo.2013.00052.
40. Luche, E.; Cousin, B.; Garidou, L.; Serino, M.; Waget, A.; Barreau, C.; André, M.; Valet, P.; Courtney, M.; Casteilla, L.; et al. Metabolic Endotoxemia Directly Increases the Proliferation of Adipocyte Precursors at the Onset of Metabolic Diseases through a CD14-Dependent Mechanism. *Mol. Metab.* **2013**, *2*, 281–291, doi:10.1016/j.molmet.2013.06.005.
41. Sorokin, L. The Impact of the Extracellular Matrix on Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 712–723, doi:10.1038/nri2852.
42. Sun, K.; Tordjman, J.; Clément, K.; Scherer, P.E. Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 470–477, doi:10.1016/j.cmet.2013.06.016.
43. Marcelin, G.; Clément, K. La fibrose du tissu adipeux - Un facteur aggravant de l'obésité. *médecine/sciences* **2018**, *34*, 424–431, doi:10.1051/medsci/20183405015.
44. Hammarstedt, A.; Gogg, S.; Hedjazifar, S.; Nerstedt, A.; Smith, U. Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 1911–1941, doi:10.1152/physrev.00034.2017.
45. Nguyen, M.T.A.; Favelyukis, S.; Nguyen, A.-K.; Reichart, D.; Scott, P.A.; Jenn, A.; Liu-Bryan, R.; Glass, C.K.; Neels, J.G.; Olefsky, J.M. A Subpopulation of Macrophages Infiltrates Hypertrophic Adipose Tissue and Is Activated by Free Fatty Acids via Toll-like Receptors 2 and 4 and JNK-Dependent Pathways. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35279–35292, doi:10.1074/jbc.M706762200.
46. Karczewski, J.; Śledzińska, E.; Baturo, A.; Jończyk, I.; Maleszko, A.; Maleszko, A.; Samborski, P.; Begier-Krasińska, B.; Dobrowolska, A. Obesity and Inflammation. *Eur. Cytokine Netw.* **2018**, *29*, 83–94, doi:10.1684/ecn.2018.0415.
47. Panteliou, E.; Miras, A.D. What Is the Role of Bariatric Surgery in the Management of Obesity? *Climacteric* **2017**, *20*, 97–102, doi:10.1080/13697137.2017.1262638.
48. Wilding, J.P.H. Treatment Strategies for Obesity. *Obes. Rev.* **2007**, *8*, 137–144, doi:10.1111/j.1467-789X.2007.00333.x.
49. Rucker, D.; Padwal, R.; Li, S.K.; Curioni, C.; Lau, D.C.W. Long Term Pharmacotherapy for Obesity and Overweight: Updated Meta-Analysis. *BMJ* **2007**, *335*, 1194–1199, doi:10.1136/bmj.39385.413113.25.
50. Yanovski, S.Z.; Yanovski, J.A. Long-Term Drug Treatment for Obesity: A Systematic and Clinical Review. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2014**, *311*, 74–86, doi:10.1001/jama.2013.281361.
51. Tak, Y.J.; Lee, S.Y. Anti-Obesity Drugs: Long-Term Efficacy and Safety: An Updated Review. *World J. Mens Health* **2021**, *39*, 208, doi:10.5534/wjmh.200010.
52. Tak, Y.J.; Lee, S.Y. Long-Term Efficacy and Safety of Anti-Obesity Treatment: Where Do We Stand? *Curr. Obes. Rep.* **2021**, *10*, 14–30, doi:10.1007/s13679-020-00422-w.
53. Anthes, E. Treatment: Marginal Gains. *Nature* **2014**, *508*, S54–S56, doi:10.1038/508S54a.

54. Wolfe, B.M.; Kvach, E.; Eckel, R.H. Treatment of Obesity: Weight Loss and Bariatric Surgery. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1844–1855, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.307591.
55. Arterburn, D.E.; Telem, D.A.; Kushner, R.F.; Courcoulas, A.P. Benefits and Risks of Bariatric Surgery in Adults: A Review. *JAMA* **2020**, *324*, 879, doi:10.1001/jama.2020.12567.
56. *Recommandations de Bonnes Pratiques. Obésité: Prise En Charge Chirurgicale Chez l'adulte. Rapport Haute Autorité de Santé (HAS). 2009. Www.Has-Sante.Fr*;
57. Nudel, J.; Sanchez, V.M. Surgical Management of Obesity. *Metabolism* **2019**, *92*, 206–216, doi:10.1016/j.metabol.2018.12.002.
58. Gletsu-Miller, N.; Wright, B.N. Mineral Malnutrition Following Bariatric Surgery. *Adv. Nutr. Bethesda Md* **2013**, *4*, 506–517, doi:10.3945/an.113.004341.
59. Courcoulas, A.P.; King, W.C.; Belle, S.H.; Berk, P.; Flum, D.R.; Garcia, L.; Gourash, W.; Horlick, M.; Mitchell, J.E.; Pomp, A.; et al. Seven-Year Weight Trajectories and Health Outcomes in the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) Study. *JAMA Surg.* **2018**, *153*, 427–434, doi:10.1001/jamasurg.2017.5025.
60. Sjöström, L.; Peltonen, M.; Jacobson, P.; Ahlin, S.; Andersson-Assarsson, J.; Anveden, Å.; Bouchard, C.; Carlsson, B.; Karason, K.; Lönroth, H.; et al. Association of Bariatric Surgery with Long-Term Remission of Type 2 Diabetes and with Microvascular and Macrovascular Complications. *JAMA* **2014**, *311*, 2297–2304, doi:10.1001/jama.2014.5988.
61. Schiavon, C.A.; Bersch-Ferreira, A.C.; Santucci, E.V.; Oliveira, J.D.; Torreglosa, C.R.; Bueno, P.T.; Frayha, J.C.; Santos, R.N.; Damiani, L.P.; Noujaim, P.M.; et al. Effects of Bariatric Surgery in Obese Patients With Hypertension: The GATEWAY Randomized Trial (Gastric Bypass to Treat Obese Patients With Steady Hypertension). *Circulation* **2018**, *137*, 1132–1142, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032130.
62. Sjöström, L.; Peltonen, M.; Jacobson, P.; Sjöström, C.D.; Karason, K.; Wedel, H.; Ahlin, S.; Anveden, Å.; Bengtsson, C.; Bergmark, G.; et al. Bariatric Surgery and Long-Term Cardiovascular Events. *JAMA* **2012**, *307*, 56–65, doi:10.1001/jama.2011.1914.
63. Aggarwal, R.; Harling, L.; Efthimiou, E.; Darzi, A.; Athanasiou, T.; Ashrafian, H. The Effects of Bariatric Surgery on Cardiac Structure and Function: A Systematic Review of Cardiac Imaging Outcomes. *Obes. Surg.* **2016**, *26*, 1030–1040, doi:10.1007/s11695-015-1866-5.
64. Frühbeck, G. Bariatric and Metabolic Surgery: A Shift in Eligibility and Success Criteria. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 465–477, doi:10.1038/nrendo.2015.84.
65. Zhang, H.; DiBaise, J.K.; Zuccolo, A.; Kudrna, D.; Braidotti, M.; Yu, Y.; Parameswaran, P.; Crowell, M.D.; Wing, R.; Rittmann, B.E.; et al. Human Gut Microbiota in Obesity and after Gastric Bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 2365–2370, doi:10.1073/pnas.0812600106.
66. Paganelli, F.L.; Luyer, M.; Hazelbag, C.M.; Uh, H.-W.; Rogers, M.R.C.; Adriaans, D.; Berbers, R.-M.; Hendrickx, A.P.A.; Viveen, M.C.; Groot, J.A.; et al. Roux-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Directly Change Gut Microbiota Composition Independent of Surgery Type. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10979, doi:10.1038/s41598-019-47332-z.
67. Moran-Ramos, S.; López-Contreras, B.E.; Canizales-Quinteros, S. Gut Microbiota in Obesity and Metabolic Abnormalities: A Matter of Composition or Functionality? *Arch. Med. Res.* **2017**, *48*, 735–753, doi:10.1016/j.arcmed.2017.11.003.
68. Cunningham, A.L.; Stephens, J.W.; Harris, D.A. A Review on Gut Microbiota: A Central Factor in the Pathophysiology of Obesity. *Lipids Health Dis.* **2021**, *20*, 65, doi:10.1186/s12944-021-01491-z.

69. Cuevas-Sierra, A.; Ramos-Lopez, O.; Riezu-Boj, J.I.; Milagro, F.I.; Martinez, J.A. Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Adv. Nutr.* **2019**, *10*, S17–S30, doi:10.1093/advances/nmy078.
70. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* **2006**, *444*, 1027–1031, doi:10.1038/nature05414.
71. Turnbaugh, P.J.; Ridaura, V.K.; Faith, J.J.; Rey, F.E.; Knight, R.; Gordon, J.I. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci. Transl. Med.* **2009**, *1*, 6ra14-6ra14, doi:10.1126/scitranslmed.3000322.
72. Ley, R.E.; Turnbaugh, P.J.; Klein, S.; Gordon, J.I. Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity. *Nature* **2006**, *444*, 1022–1023, doi:10.1038/4441022a.
73. Cani, P.D.; Bibiloni, R.; Knauf, C.; Waget, A.; Neyrinck, A.M.; Delzenne, N.M.; Burcelin, R. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* **2008**, *57*, 1470–1481, doi:10.2337/db07-1403.
74. Amar, J.; Chabo, C.; Waget, A.; Klopp, P.; Vachoux, C.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Smirnova, N.; Bergé, M.; Sulpice, T.; Lahtinen, S.; et al. Intestinal Mucosal Adherence and Translocation of Commensal Bacteria at the Early Onset of Type 2 Diabetes: Molecular Mechanisms and Probiotic Treatment. *EMBO Mol. Med.* **2011**, *3*, 559–572, doi:10.1002/emmm.201100159.
75. Cani, P.D.; Amar, J.; Iglesias, M.A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A.M.; Fava, F.; Tuohy, K.M.; Chabo, C.; et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **2007**, *56*, 1761–1772, doi:10.2337/db06-1491.
76. Delzenne, N.M.; Cani, P.D. Implication de La Flore Intestinale Dans Le Métabolisme Énergétique. *médecine/sciences* **2008**, *24*, 505–510, doi:10.1051/medsci/2008245505.
77. Ballini, A.; Scacco, S.; Boccellino, M.; Santacroce, L.; Arrigoni, R. Microbiota and Obesity: Where Are We Now? *Biology* **2020**, *9*, 415, doi:10.3390/biology9120415.
78. Cani, P.D.; Neyrinck, A.M.; Maton, N.; Delzenne, N.M. Oligofructose Promotes Satiety in Rats Fed a High-Fat Diet: Involvement of Glucagon-like Peptide-1. *Obes. Res.* **2005**, *13*, 1000–1007, doi:10.1038/oby.2005.117.
79. Cani, P.D.; Dewever, C.; Delzenne, N.M. Inulin-Type Fructans Modulate Gastrointestinal Peptides Involved in Appetite Regulation (Glucagon-like Peptide-1 and Ghrelin) in Rats. *Br. J. Nutr.* **2004**, *92*, 521–526, doi:10.1079/bjn20041225.
80. Cano, P.G.; Santacruz, A.; Trejo, F.M.; Sanz, Y. Bifidobacterium CECT 7765 Improves Metabolic and Immunological Alterations Associated with Obesity in High-Fat Diet-Fed Mice. *Obes. Silver Spring Md* **2013**, *21*, 2310–2321, doi:10.1002/oby.20330.
81. Núñez, I.N.; Galdeano, C.M.; de LeBlanc, A. de M.; Perdigón, G. Evaluation of Immune Response, Microbiota, and Blood Markers after Probiotic Bacteria Administration in Obese Mice Induced by a High-Fat Diet. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **2014**, *30*, 1423–1432, doi:10.1016/j.nut.2014.03.025.
82. Park, S.; Bae, J.-H. Probiotics for Weight Loss: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutr. Res. N. Y. N* **2015**, *35*, 566–575, doi:10.1016/j.nutres.2015.05.008.
83. Singh, R.; Nieuwdorp, M.; ten Berge, I.J.M.; Bemelman, F.J.; Geerlings, S.E. The Potential Beneficial Role of Faecal Microbiota Transplantation in Diseases Other than Clostridium Difficile Infection. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1119–1125, doi:10.1111/1469-0691.12799.
84. Vrieze, A.; Van Nood, E.; Holleman, F.; Salojärvi, J.; Kootte, R.S.; Bartelsman, J.F.W.M.; Dallinga-Thie, G.M.; Ackermans, M.T.; Serlie, M.J.; Oozeer, R.; et al.

Transfer of Intestinal Microbiota from Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals with Metabolic Syndrome. *Gastroenterology* **2012**, *143*, 913-916.e7, doi:10.1053/j.gastro.2012.06.031.
85. Li, S.S.; Zhu, A.; Benes, V.; Costea, P.I.; Hercog, R.; Hildebrand, F.; Huerta-Cepas, J.; Nieuwdorp, M.; Salojärvi, J.; Voigt, A.Y.; et al. Durable Coexistence of Donor and Recipient Strains after Fecal Microbiota Transplantation. *Science* **2016**, *352*, 586–589, doi:10.1126/science.aad8852.
86. Gest, H. The Discovery of Microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, Fellows of the Royal Society. *Notes Rec. R. Soc. Lond.* **2004**, *58*, 187–201, doi:10.1098/rsnr.2004.0055.
87. Zhang, Y.; Wang, X.; Li, H.; Ni, C.; Du, Z.; Yan, F. Human Oral Microbiota and Its Modulation for Oral Health. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *99*, 883–893, doi:10.1016/j.biopha.2018.01.146.
88. Thomas, C.; Minty, M.; Vinel, A.; Canceill, T.; Loubières, P.; Burcelin, R.; Kaddech, M.; Blasco-Baque, V.; Laurencin-Dalicieux, S. Oral Microbiota: A Major Player in the Diagnosis of Systemic Diseases. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1376, doi:10.3390/diagnostics11081376.
89. Hajishengallis, G. Periodontitis: From Microbial Immune Subversion to Systemic Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 30–44, doi:10.1038/nri3785.
90. Verma, D.; Garg, P.K.; Dubey, A.K. Insights into the Human Oral Microbiome. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 525–540, doi:10.1007/s00203-018-1505-3.
91. Hug, L.A.; Baker, B.J.; Anantharaman, K.; Brown, C.T.; Probst, A.J.; Castelle, C.J.; Butterfield, C.N.; Hernsdorf, A.W.; Amano, Y.; Ise, K.; et al. A New View of the Tree of Life. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16048, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.48.
92. Baker, J.L.; Bor, B.; Agnello, M.; Shi, W.; He, X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 362–374, doi:10.1016/j.tim.2016.12.012.
93. Aas, J.A.; Paster, B.J.; Stokes, L.N.; Olsen, I.; Dewhirst, F.E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 5721–5732, doi:10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
94. Xu, X.; He, J.; Xue, J.; Wang, Y.; Li, K.; Zhang, K.; Guo, Q.; Liu, X.; Zhou, Y.; Cheng, L.; et al. Oral Cavity Contains Distinct Niches with Dynamic Microbial Communities: Oral Microbiome Differs by Age and Location. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 699–710, doi:10.1111/1462-2920.12502.
95. Chardin, H.; Barsotti, O.; Bonnaure-Mallet, M. *Microbiologie en odonto-stomatologie*; Collection dirigée par Jean-François d'Ivernois; Maloine: Paris, 2006; ISBN 978-2-224-02928-9.
96. Tuominen, H.; Collado, M.C.; Rautava, J.; Syrjänen, S.; Rautava, S. Composition and Maternal Origin of the Neonatal Oral Cavity Microbiota. *J. Oral Microbiol.* **2019**, *11*, 1663084, doi:10.1080/20002297.2019.1663084.
97. Kaan, A.M. (Marije); Kahharova, D.; Zaura, E. Acquisition and Establishment of the Oral Microbiota. *Periodontol. 2000* **2021**, *86*, 123–141, doi:10.1111/prd.12366.
98. Mukherjee, C.; Moyer, C.O.; Steinkamp, H.M.; Hashmi, S.B.; Beall, C.J.; Guo, X.; Ni, A.; Leys, E.J.; Griffen, A.L. Acquisition of Oral Microbiota Is Driven by Environment, Not Host Genetics. *Microbiome* **2021**, *9*, 54, doi:10.1186/s40168-020-00986-8.
99. Brito, I.L.; Gurry, T.; Zhao, S.; Huang, K.; Young, S.K.; Shea, T.P.; Naisilisili, W.; Jenkins, A.P.; Jupiter, S.D.; Gevers, D.; et al. Transmission of Human-Associated Microbiota along Family and Social Networks. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 964–971, doi:10.1038/s41564-019-0409-6.

100. Payne, M.A.; Hashim, A.; Alsam, A.; Joseph, S.; Aduse-Opoku, J.; Wade, W.G.; Curtis, M.A. Horizontal and Vertical Transfer of Oral Microbial Dysbiosis and Periodontal Disease. *J. Dent. Res.* **2019**, *98*, 1503–1510, doi:10.1177/0022034519877150.
101. Freire, M.; Moustafa, A.; Harkins, D.M.; Torralba, M.G.; Zhang, Y.; Leong, P.; Saffery, R.; Bockmann, M.; Kuelbs, C.; Hughes, T.; et al. Longitudinal Study of Oral Microbiome Variation in Twins. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 7954, doi:10.1038/s41598-020-64747-1.
102. Dewhirst, F.E.; Chen, T.; Izard, J.; Paster, B.J.; Tanner, A.C.R.; Yu, W.-H.; Lakshmanan, A.; Wade, W.G. The Human Oral Microbiome. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 5002–5017, doi:10.1128/JB.00542-10.
103. Dominguez-Bello, M.G.; Costello, E.K.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Fierer, N.; Knight, R. Delivery Mode Shapes the Acquisition and Structure of the Initial Microbiota across Multiple Body Habitats in Newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 11971–11975, doi:10.1073/pnas.1002601107.
104. Mason, M.R.; Chambers, S.; Dabdoub, S.M.; Thikkurissy, S.; Kumar, P.S. Characterizing Oral Microbial Communities across Dentition States and Colonization Niches. *Microbiome* **2018**, *6*, 67, doi:10.1186/s40168-018-0443-2.
105. Mombelli, A.; Gusberti, F.A.; Oosten, M.A.C. van; Lang, N.P. Gingival Health and Gingivitis Development during Puberty. *J. Clin. Periodontol.* **1989**, *16*, 451–456, doi:10.1111/j.1600-051X.1989.tb01674.x.
106. Mombelli, A.; Lang, N.P.; Bürgin, W.B.; Gusberti, F.A. Microbial Changes Associated with the Development of Puberty Gingivitis. *J. Periodontal Res.* **1990**, *25*, 331–338, doi:10.1111/j.1600-0765.1990.tb00924.x.
107. Gusberti, F.A.; Mombelli, A.; Lang, N.P.; Minder, C.E. Changes in Subgingival Microbiota during Puberty. *J. Clin. Periodontol.* **1990**, *17*, 685–692, doi:10.1111/j.1600-051X.1990.tb01054.x.
108. Weyrich, L.S. The Evolutionary History of the Human Oral Microbiota and Its Implications for Modern Health. *Periodontol. 2000* **2021**, *85*, 90–100, doi:10.1111/prd.12353.
109. Sedghi, L.; DiMassa, V.; Harrington, A.; Lynch, S.V.; Kapila, Y.L. The Oral Microbiome: Role of Key Organisms and Complex Networks in Oral Health and Disease. *Periodontol. 2000* **2021**, *87*, 107–131, doi:10.1111/prd.12393.
110. Marsh, P.D.; Do, T.; Beighton, D.; Devine, D.A. Influence of Saliva on the Oral Microbiota. *Periodontol. 2000* **2016**, *70*, 80–92, doi:10.1111/prd.12098.
111. Lynge Pedersen, A.M.; Belstrøm, D. The Role of Natural Salivary Defences in Maintaining a Healthy Oral Microbiota. *J. Dent.* **2019**, *80*, S3–S12, doi:10.1016/j.jdent.2018.08.010.
112. Humphrey, S.P.; Williamson, R.T. A Review of Saliva: Normal Composition, Flow, and Function. *J. Prosthet. Dent.* **2001**, *85*, 162–169, doi:10.1067/mpr.2001.113778.
113. Fábián, T.K.; Hermann, P.; Beck, A.; Fejérdy, P.; Fábián, G. Salivary Defense Proteins: Their Network and Role in Innate and Acquired Oral Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 4295–4320, doi:10.3390/ijms13044295.
114. Pellat B. Salives et Milieu Buccal. EMC, Médecine Buccale, 28-150-H-10, 2010.
115. Knight, R.; Vrbanac, A.; Taylor, B.C.; Aksenov, A.; Callewaert, C.; Debelius, J.; Gonzalez, A.; Kosciolek, T.; McCall, L.-I.; McDonald, D.; et al. Best Practices for Analysing Microbiomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 410–422, doi:10.1038/s41579-018-0029-9.
116. Galloway-Peña, J.; Hanson, B. Tools for Analysis of the Microbiome. *Dig. Dis. Sci.* **2020**, *65*, 674–685, doi:10.1007/s10620-020-06091-y.

117. Quince, C.; Walker, A.W.; Simpson, J.T.; Loman, N.J.; Segata, N. Shotgun Metagenomics, from Sampling to Analysis. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 833–844, doi:10.1038/nbt.3935.
118. Weinstock, G.M. Genomic Approaches to Studying the Human Microbiota. *Nature* **2012**, *489*, 250–256, doi:10.1038/nature11553.
119. Diene, S.M.; Bertelli, C.; Pillonel, T.; Schrenzel, J.; Greub, G. Génomique et Métagénomique Bactériennes : Applications Cliniques et Importance Médicale. *Rev. Médicale Suisse* **2014**, *10*.
120. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic Biomarker Discovery and Explanation. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60, doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.
121. Thomas, C.; Minty, M.; Canceill, T.; Loubières, P.; Azalbert, V.; Tercé, F.; Champion, C.; Burcelin, R.; Barthet, P.; Laurencin-Dalicieux, S.; et al. Obesity Drives an Oral Microbiota Signature of Female Patients with Periodontitis: A Pilot Study. *Diagnostics* **2021**, *11*, 745, doi:10.3390/diagnostics11050745.
122. Kim, B.-R.; Shin, J.; Guevarra, R.B.; Lee, J.H.; Kim, D.W.; Seol, K.-H.; Lee, J.-H.; Kim, H.B.; Isaacson, R.E. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 2089–2093, doi:10.4014/jmb.1709.09027.
123. Kuczynski, J.; Lauber, C.L.; Walters, W.A.; Parfrey, L.W.; Clemente, J.C.; Gevers, D.; Knight, R. Experimental and Analytical Tools for Studying the Human Microbiome. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *13*, 47–58, doi:10.1038/nrg3129.
124. Staley, C.; Kaiser, T.; Khoruts, A. Clinician Guide to Microbiome Testing. *Dig. Dis. Sci.* **2018**, *63*, 3167–3177, doi:10.1007/s10620-018-5299-6.
125. Barwell, L.J.; Isaac, N.J.B.; Kunin, W.E. Measuring B-diversity with Species Abundance Data. *J. Anim. Ecol.* **2015**, *84*, 1112–1122, doi:10.1111/1365-2656.12362.
126. Xia, Y.; Sun, J. Hypothesis Testing and Statistical Analysis of Microbiome. *Genes Dis.* **2017**, *4*, 138–148, doi:10.1016/j.gendis.2017.06.001.
127. Lamont, R.J.; Koo, H.; Hajishengallis, G. The Oral Microbiota: Dynamic Communities and Host Interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 745–759, doi:10.1038/s41579-018-0089-x.
128. Rosier, B.T.; Marsh, P.D.; Mira, A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J. Dent. Res.* **2018**, *97*, 371–380, doi:10.1177/0022034517742139.
129. Roberts, F.A.; Darveau, R.P. Microbial Protection and Virulence in Periodontal Tissue as a Function of Polymicrobial Communities: Symbiosis and Dysbiosis. *Periodontol. 2000* **2015**, *69*, 18–27, doi:10.1111/prd.12087.
130. Hojo, K.; Nagaoka, S.; Ohshima, T.; Maeda, N. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 982–990, doi:10.1177/0022034509346811.
131. Li, J.; Helmerhorst, E.J.; Leone, C.W.; Troxler, R.F.; Yaskell, T.; Haffajee, A.D.; Socransky, S.S.; Oppenheim, F.G. Identification of Early Microbial Colonizers in Human Dental Biofilm. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 1311–1318, doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02420.x.
132. Bouchard, P. *Médecine parodontale*; Parodontologie & dentisterie implantaire; Lavoisier-Médecine sciences: Paris, 2014; ISBN 978-2-257-20555-1.
133. Marsh, P.D.; Zaura, E. Dental Biofilm: Ecological Interactions in Health and Disease. *J. Clin. Periodontol.* **2017**, *44*, S12–S22, doi:10.1111/jcpe.12679.
134. Takahashi, N.; Nyvad, B. The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. *J. Dent. Res.* **2011**, *90*, 294–303, doi:10.1177/0022034510379602.

135. Hajishengallis, E.; Parsaei, Y.; Klein, M.I.; Koo, H. Advances in the Microbial Etiology and Pathogenesis of Early Childhood Caries. *Mol. Oral Microbiol.* **2017**, *32*, 24–34, doi:10.1111/omi.12152.
136. Mira, A.; Simon-Soro, A.; Curtis, M.A. Role of Microbial Communities in the Pathogenesis of Periodontal Diseases and Caries. *J. Clin. Periodontol.* **2017**, *44*, S23–S38, doi:10.1111/jcpe.12671.
137. Tanner, A.C.R.; Kressirer, C.A.; Rothmiller, S.; Johansson, I.; Chalmers, N.I. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Adv. Dent. Res.* **2018**, *29*, 78–85, doi:10.1177/0022034517736496.
138. Bisson, C.; Lec, P.-H.; Blique, M.; Thilly, N.; Machouart, M. Presence of Trichomonads in Subgingival Biofilm of Patients with Periodontitis: Preliminary Results. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 3767–3774, doi:10.1007/s00436-018-6077-2.
139. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C.; Kent, R.L. Microbial Complexes in Subgingival Plaque. *J. Clin. Periodontol.* **1998**, *25*, 134–144, doi:10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x.
140. Armitage, G.C.; Dickinson, W.R.; Jenderseck, R.S.; Levine, S.M.; Chambers, D.W. Relationship Between the Percentage of Subgingival Spirochetes and the Severity of Periodontal Disease. *J. Periodontol.* **1982**, *53*, 550–556, doi:10.1902/jop.1982.53.9.550.
141. Curtis, M.A.; Diaz, P.I.; Van Dyke, T.E. The Role of the Microbiota in Periodontal Disease. *Periodontol. 2000* **2020**, *83*, 14–25, doi:10.1111/prd.12296.
142. Abusleme, L.; Dupuy, A.K.; Dutzan, N.; Silva, N.; Burleson, J.A.; Strausbaugh, L.D.; Gamonal, J.; Diaz, P.I. The Subgingival Microbiome in Health and Periodontitis and Its Relationship with Community Biomass and Inflammation. *ISME J.* **2013**, *7*, 1016–1025, doi:10.1038/ismej.2012.174.
143. Scannapieco, F.A.; Dongari-Bagtzoglou, A. Dysbiosis Revisited. Understanding the Role of the Oral Microbiome in the Pathogenesis of Gingivitis and Periodontitis: A Critical Assessment. *J. Periodontol.* **2021**, JPER.21-0120, doi:10.1002/JPER.21-0120.
144. Loh, G.; Blaut, M. Role of Commensal Gut Bacteria in Inflammatory Bowel Diseases. *Gut Microbes* **2012**, *3*, 544–555, doi:10.4161/gmic.22156.
145. Abusleme, L.; Hoare, A.; Hong, B.; Diaz, P.I. Microbial Signatures of Health, Gingivitis, and Periodontitis. *Periodontol. 2000* **2021**, *86*, 57–78, doi:10.1111/prd.12362.
146. Maekawa, T.; Krauss, J.L.; Abe, T.; Jotwani, R.; Triantafilou, M.; Triantafilou, K.; Hashim, A.; Hoch, S.; Curtis, M.A.; Nussbaum, G.; et al. Porphyromonas Gingivalis Manipulates Complement and TLR Signaling to Uncouple Bacterial Clearance from Inflammation and Promote Dysbiosis. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 768–778, doi:10.1016/j.chom.2014.05.012.
147. Popadiak, K.; Potempa, J.; Riesbeck, K.; Blom, A.M. Biphasic Effect of Gingipains from Porphyromonas Gingivalis on the Human Complement System. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2007**, *178*, 7242–7250, doi:10.4049/jimmunol.178.11.7242.
148. Potempa, M.; Potempa, J.; Kantyka, T.; Nguyen, K.-A.; Wawrzonek, K.; Manandhar, S.P.; Popadiak, K.; Riesbeck, K.; Eick, S.; Blom, A.M. Interpain A, a Cysteine Proteinase from Prevotella Intermedia, Inhibits Complement by Degrading Complement Factor C3. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000316, doi:10.1371/journal.ppat.1000316.
149. Jusko, M.; Potempa, J.; Karim, A.Y.; Ksiazek, M.; Riesbeck, K.; Garred, P.; Eick, S.; Blom, A.M. A Metalloproteinase Karilysin Present in the Majority of Tannerella Forsythia Isolates Inhibits All Pathways of the Complement System. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2012**, *188*, 2338–2349, doi:10.4049/jimmunol.1101240.

150. Di Benedetto, A.; Gigante, I.; Colucci, S.; Grano, M. Periodontal Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 503754, doi:10.1155/2013/503754.
151. Taubman, M.A.; Valverde, P.; Han, X.; Kawai, T. Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. *J. Periodontol.* **2005**, *76 Suppl 11S*, 2033–2041, doi:10.1902/jop.2005.76.11-S.2033.
152. Kajiya, M.; Giro, G.; Taubman, M.A.; Han, X.; Mayer, M.P.A.; Kawai, T. Role of Periodontal Pathogenic Bacteria in RANKL-Mediated Bone Destruction in Periodontal Disease. *J. Oral Microbiol.* **2010**, *2*, doi:10.3402/jom.v2i0.5532.
153. Hettne, K.M.; Weeber, M.; Laine, M.L.; Cate, H. ten; Boyer, S.; Kors, J.A.; Loos, B.G. Automatic Mining of the Literature to Generate New Hypotheses for the Possible Link between Periodontitis and Atherosclerosis: Lipopolysaccharide as a Case Study. *J. Clin. Periodontol.* **2007**, *34*, 1016–1024, doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01152.x.
154. Zelkha, S.A.; Freilich, R.W.; Amar, S. Periodontal Innate Immune Mechanisms Relevant to Atherosclerosis and Obesity: Influence of Periodontal Disease on Obesity and Atherosclerosis. *Periodontol. 2000* **2010**, *54*, 207–221, doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00358.x.
155. Słotwińska, S.M.; Słotwiński, R. Host Response, Obesity, and Oral Health. *Cent.-Eur. J. Immunol.* **2015**, *40*, 201–205, doi:10.5114/ceji.2015.52834.
156. Paisi, M.; Kay, E.; Bennett, C.; Kaimi, I.; Witton, R.; Nelder, R.; Lapthorne, D. Body Mass Index and Dental Caries in Young People: A Systematic Review. *BMC Pediatr.* **2019**, *19*, 122, doi:10.1186/s12887-019-1511-x.
157. Alshihri, A.A.; Rogers, H.J.; Alqahtani, M.A.; Aldossary, M.S. Association between Dental Caries and Obesity in Children and Young People: A Narrative Review. *Int. J. Dent.* **2019**, *2019*, 1–8, doi:10.1155/2019/9105759.
158. Roa, I.; del Sol, M. Obesity, Salivary Glands and Oral Pathology. *Colomb. Medica* **2018**, 280–287, doi:10.25100/cm.v49i4.3919.
159. Albandar, J.M.; Susin, C.; Hughes, F.J. Manifestations of Systemic Diseases and Conditions That Affect the Periodontal Attachment Apparatus: Case Definitions and Diagnostic Considerations. *J. Periodontol.* **2018**, *89 Suppl 1*, S183–S203, doi:10.1002/JPER.16-0480.
160. Jepsen, S.; Caton, J.G.; Albandar, J.M.; Bissada, N.F.; Bouchard, P.; Cortellini, P.; Demirel, K.; de Sanctis, M.; Ercoli, C.; Fan, J.; et al. Periodontal Manifestations of Systemic Diseases and Developmental and Acquired Conditions: Consensus Report of Workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.* **2018**, *89 Suppl 1*, S237–S248, doi:10.1002/JPER.17-0733.
161. Suvan, J.; D'Aiuto, F.; Moles, D.R.; Petrie, A.; Donos, N. Association between Overweight/Obesity and Periodontitis in Adults. A Systematic Review. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **2011**, *12*, e381-404, doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00808.x.
162. Jepsen, S.; Suvan, J.; Deschner, J. The Association of Periodontal Diseases with Metabolic Syndrome and Obesity. *Periodontol. 2000* **2020**, *83*, 125–153, doi:10.1111/prd.12326.
163. Zimmermann, G.S.; Bastos, M.F.; Dias Gonçalves, T.E.; Chambrone, L.; Duarte, P.M. Local and Circulating Levels of Adipocytokines in Obese and Normal Weight Individuals with Chronic Periodontitis. *J. Periodontol.* **2013**, *84*, 624–633, doi:10.1902/jop.2012.120254.
164. Zuza, E.P.; Barroso, E.M.; Carrareto, A.L.V.; Pires, J.R.; Carlos, I.Z.; Theodoro, L.H.; Toledo, B.E.C. The Role of Obesity as a Modifying Factor in Patients Undergoing Non-

Surgical Periodontal Therapy. *J. Periodontol.* **2011**, *82*, 676–682, doi:10.1902/jop.2010.100545.
165. Boyapati, R.; Chintalapani, S.; Ramisetti, A.; Salavadhi, S.S.; Ramachandran, R. Evaluation of Serum Leptin and Adiponectin in Obese Individuals with Chronic Periodontitis. *Contemp. Clin. Dent.* **2018**, *9*, S210–S214, doi:10.4103/ccd.ccd_1_18.
166. Garlet, G.P. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-Appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 1349–1363, doi:10.1177/0022034510376402.
167. Amar, S.; Leeman, S. Periodontal Innate Immune Mechanisms Relevant to Obesity. *Mol. Oral Microbiol.* **2013**, *28*, 331–341, doi:10.1111/omi.12035.
168. Huang, X.; Yu, T.; Ma, C.; Wang, Y.; Xie, B.; Xuan, D.; Zhang, J. Macrophages Play a Key Role in the Obesity-Induced Periodontal Innate Immune Dysfunction via Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Protein 3 Pathway. *J. Periodontol.* **2016**, *87*, 1195–1205, doi:10.1902/jop.2016.160102.
169. Endo, Y.; Tomofuji, T.; Ekuni, D.; Irie, K.; Azuma, T.; Tamaki, N.; Yamamoto, T.; Morita, M. Experimental Periodontitis Induces Gene Expression of Proinflammatory Cytokines in Liver and White Adipose Tissues in Obesity. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 520–526, doi:10.1902/jop.2009.090574.
170. Huang, Y.; Zeng, J.; Chen, G.; Xie, X.; Guo, W.; Tian, W. Periodontitis Contributes to Adipose Tissue Inflammation through the NF-<kappa>B, JNK and ERK Pathways to Promote Insulin Resistance in a Rat Model. *Microbes Infect.* **2016**, *18*, 804–812, doi:10.1016/j.micinf.2016.08.002.
171. Le Sage, F.; Meilhac, O.; Gonthier, M.-P. Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide Induces Pro-Inflammatory Adipokine Secretion and Oxidative Stress by Regulating Toll-like Receptor-Mediated Signaling Pathways and Redox Enzymes in Adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *446*, 102–110, doi:10.1016/j.mce.2017.02.022.
172. Wu, Y.; Chi, X.; Zhang, Q.; Chen, F.; Deng, X. Characterization of the Salivary Microbiome in People with Obesity. *PeerJ* **2018**, *6*, e4458, doi:10.7717/peerj.4458.
173. Saito, T.; Shimazaki, Y. Metabolic Disorders Related to Obesity and Periodontal Disease. *Periodontol. 2000* **2007**, *43*, 254–266, doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00186.x.
174. Haffajee, A.D.; Socransky, S.S. Relation of Body Mass Index, Periodontitis and *Tannerella Forsythia*. *J. Clin. Periodontol.* **2009**, *36*, 89–99, doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01356.x.
175. Silva-Boghossian, C.M.; Cesário, P.C.; Leão, A.T.T.; Colombo, A.P.V. Subgingival Microbial Profile of Obese Women with Periodontal Disease. *J. Periodontol.* **2018**, *89*, 186–194, doi:10.1002/JPER.17-0236.
176. Goodson, J.M.; Groppo, D.; Halem, S.; Carpino, E. Is Obesity an Oral Bacterial Disease? *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 519–523, doi:10.1177/0022034509338353.
177. Raju, S.C.; Lagström, S.; Ellonen, P.; de Vos, W.M.; Eriksson, J.G.; Weiderpass, E.; Rounge, T.B. Gender-Specific Associations Between Saliva Microbiota and Body Size. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 767, doi:10.3389/fmicb.2019.00767.
178. de Andrade, P.A.M.; Giovani, P.A.; Araujo, D.S.; de Souza, A.J.; Pedroni-Pereira, A.; Kantovitz, K.R.; Andreote, F.D.; Castelo, P.M.; Nociti-Jr, F.H. Shifts in the Bacterial Community of Saliva Give Insights on the Relationship between Obesity and Oral Microbiota in Adolescents. *Arch. Microbiol.* **2020**, *202*, 1085–1095, doi:10.1007/s00203-020-01817-y.
179. Blasco-Baque, V.; Garidou, L.; Pomié, C.; Escoula, Q.; Loubieres, P.; Le Gall-David, S.; Lemaitre, M.; Nicolas, S.; Klopp, P.; Waget, A.; et al. Periodontitis Induced by Porphyromonas Gingivalis Drives Periodontal Microbiota Dysbiosis and Insulin

Resistance via an Impaired Adaptive Immune Response. *Gut* **2017**, *66*, 872–885, doi:10.1136/gutjnl-2015-309897.
180. Mougeot, J.-L.C.; Stevens, C.B.; Paster, B.J.; Brennan, M.T.; Lockhart, P.B.; Mougeot, F.K.B. Porphyromonas Gingivalis Is the Most Abundant Species Detected in Coronary and Femoral Arteries. *J. Oral Microbiol.* **2017**, *9*, 1281562, doi:10.1080/20002297.2017.1281562.
181. Oliveira, F.A.F.; Forte, C.P.F.; Silva, P.G. de B.; Lopes, C.B.; Montenegro, R.C.; Santos, Â.K.C.R.D.; Sobrinho, C.R.M.R.; Mota, M.R.L.; Sousa, F.B.; Alves, A.P.N.N. Molecular Analysis of Oral Bacteria in Heart Valve of Patients With Cardiovascular Disease by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Medicine (Baltimore)* **2015**, *94*, e2067, doi:10.1097/MD.0000000000002067.
182. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* **2006**, *444*, 1027–1031, doi:10.1038/nature05414.
183. Turnbaugh, P.J.; Ridaura, V.K.; Faith, J.J.; Rey, F.E.; Knight, R.; Gordon, J.I. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci. Transl. Med.* **2009**, *1*, 6ra14, doi:10.1126/scitranslmed.3000322.
184. Le Chatelier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J.-M.; Kennedy, S.; et al. Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers. *Nature* **2013**, *500*, 541–546, doi:10.1038/nature12506.
185. Maciel, S.S.; Feres, M.; Gonçalves, T.E.D.; Zimmermann, G.S.; da Silva, H.D.P.; Figueiredo, L.C.; Duarte, P.M. Does Obesity Influence the Subgingival Microbiota Composition in Periodontal Health and Disease? *J. Clin. Periodontol.* **2016**, *43*, 1003–1012, doi:10.1111/jcpe.12634.
186. Zeigler, C.C.; Persson, G.R.; Wondimu, B.; Marcus, C.; Sobko, T.; Modéer, T. Microbiota in the Oral Subgingival Biofilm Is Associated with Obesity in Adolescence. *Obes. Silver Spring Md* **2012**, *20*, 157–164, doi:10.1038/oby.2011.305.
187. Chapple, I.L.C.; Mealey, B.L.; Van Dyke, T.E.; Bartold, P.M.; Dommisch, H.; Eickholz, P.; Geisinger, M.L.; Genco, R.J.; Glogauer, M.; Goldstein, M.; et al. Periodontal Health and Gingival Diseases and Conditions on an Intact and a Reduced Periodontium: Consensus Report of Workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.* **2018**, *89 Suppl 1*, S74–S84, doi:10.1002/JPER.17-0719.
188. Papapanou, P.N.; Sanz, M.; Buduneli, N.; Dietrich, T.; Feres, M.; Fine, D.H.; Flemmig, T.F.; Garcia, R.; Giannobile, W.V.; Graziani, F.; et al. Periodontitis: Consensus Report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45 Suppl 20*, S162–S170, doi:10.1111/jcpe.12946.
189. Newton, S.; Braithwaite, D.; Akinyemiju, T.F. Socio-Economic Status over the Life Course and Obesity: Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One* **2017**, *12*, e0177151, doi:10.1371/journal.pone.0177151.
190. Schuch, H.S.; Peres, K.G.; Singh, A.; Peres, M.A.; Do, L.G. Socioeconomic Position during Life and Periodontitis in Adulthood: A Systematic Review. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **2017**, *45*, 201–208, doi:10.1111/cdoe.12278.
191. Department of Health Public Health Research Consortium; Law, C.; Power, C.; Graham, H.; Merrick, D. Obesity and Health Inequalities. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **2007**, *8 Suppl 1*, 19–22, doi:10.1111/j.1467-789X.2007.00312.x.

192. Khan, S.; Barrington, G.; Bettiol, S.; Barnett, T.; Crocombe, L. Is Overweight/Obesity a Risk Factor for Periodontitis in Young Adults and Adolescents?: A Systematic Review. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **2018**, *19*, 852–883, doi:10.1111/obr.12668.
193. Chaffee, B.W.; Weston, S.J. Association between Chronic Periodontal Disease and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 1708–1724, doi:10.1902/jop.2010.100321.
194. Saito, T.; Shimazaki, Y.; Koga, T.; Tsuzuki, M.; Ohshima, A. Relationship between Upper Body Obesity and Periodontitis. *J. Dent. Res.* **2001**, *80*, 1631–1636, doi:10.1177/00220345010800070701.
195. Cuschieri, S. The STROBE Guidelines. *Saudi J. Anaesth.* **2019**, *13*, S31–S34, doi:10.4103/sja.SJA_543_18.
196. Minty, M.; Loubières, P.; Canceill, T.; Azalbert, V.; Burcelin, R.; Tercé, F.; Blasco-Baque, V. Gender-Associated Differences in Oral Microbiota and Salivary Biochemical Parameters in Response to Feeding. *J. Physiol. Biochem.* **2021**, *77*, 155–166, doi:10.1007/s13105-020-00757-x.
197. Escudié, F.; Auer, L.; Bernard, M.; Mariadassou, M.; Cauquil, L.; Vidal, K.; Maman, S.; Hernandez-Raquet, G.; Combes, S.; Pascal, G. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2018**, *34*, 1287–1294, doi:10.1093/bioinformatics/btx791.
198. Jafari, M.; Ansari-Pour, N. Why, When and How to Adjust Your P Values? *Cell J.* **2019**, *20*, 604–607, doi:10.22074/cellj.2019.5992.
199. Vallim, A.C.; Gaio, E.J.; Oppermann, R.V.; Rösing, C.K.; Albandar, J.M.; Susin, C.; Haas, A.N. Obesity as a Risk Factor for Tooth Loss over 5 Years: A Population-Based Cohort Study. *J. Clin. Periodontol.* **2021**, *48*, 14–23, doi:10.1111/jcpe.13378.
200. Gonçalves, T.E.D.; Zimmermann, G.S.; Figueiredo, L.C.; Souza, M. de C.; da Cruz, D.F.; Bastos, M.F.; da Silva, H.D.P.; Duarte, P.M. Local and Serum Levels of Adipokines in Patients with Obesity after Periodontal Therapy: One-Year Follow-Up. *J. Clin. Periodontol.* **2015**, *42*, 431–439, doi:10.1111/jcpe.12396.
201. Taylor, J.J. Cytokine Regulation of Immune Responses to Porphyromonas Gingivalis. *Periodontol. 2000* **2010**, *54*, 160–194, doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00344.x.
202. Zelkha, S.A.; Freilich, R.W.; Amar, S. Periodontal Innate Immune Mechanisms Relevant to Atherosclerosis and Obesity. *Periodontol. 2000* **2010**, *54*, 207–221, doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00358.x.
203. Akira, S.; Takeda, K. Toll-like Receptor Signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 499–511, doi:10.1038/nri1391.
204. Rogero, M.M.; Calder, P.C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients* **2018**, *10*, E432, doi:10.3390/nu10040432.
205. Houstis, N.; Rosen, E.D.; Lander, E.S. Reactive Oxygen Species Have a Causal Role in Multiple Forms of Insulin Resistance. *Nature* **2006**, *440*, 944–948, doi:10.1038/nature04634.
206. Shiau, H.J.; Reynolds, M.A. Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: Exploring the Biologic Basis. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 1505–1517, doi:10.1902/jop.2010.100045.
207. Shiau, H.J.; Reynolds, M.A. Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: A Systematic Review. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 1379–1389, doi:10.1902/jop.2010.100044.
208. Philip, N.; Suneja, B.; Walsh, L. Beyond Streptococcus Mutans: Clinical Implications of the Evolving Dental Caries Aetiological Paradigms and Its Associated Microbiome. *Br. Dent. J.* **2018**, *224*, 219–225, doi:10.1038/sj.bdj.2018.81.
209. Besser, J.; Carleton, H.A.; Gerner-Smidt, P.; Lindsey, R.L.; Trees, E. Next-Generation Sequencing Technologies and Their Application to the Study and Control of Bacterial

Infections. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 335–341, doi:10.1016/j.cmi.2017.10.013.
210. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Smith, C.; Martin, L.; Haffajee, J.A.; Uzel, N.G.; Goodson, J.M. Use of Checkerboard DNA-DNA Hybridization to Study Complex Microbial Ecosystems. *Oral Microbiol. Immunol.* **2004**, *19*, 352–362, doi:10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x.
211. Nibali, L.; Sousa, V.; Davrandi, M.; Spratt, D.; Alyahya, Q.; Dopico, J.; Donos, N. Differences in the Periodontal Microbiome of Successfully Treated and Persistent Aggressive Periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2020**, *47*, 980–990, doi:10.1111/jcpe.13330.
212. Thirumala, R.; Rappo, U.; Babady, N.E.; Kamboj, M.; Chawla, M. Capnocytophaga Lung Abscess in a Patient with Metastatic Neuroendocrine Tumor. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 204–207, doi:10.1128/JCM.05306-11.
213. Le Chatelier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J.-M.; Kennedy, S.; et al. Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers. *Nature* **2013**, *500*, 541–546, doi:10.1038/nature12506.
214. Ley, R.E.; Turnbaugh, P.J.; Klein, S.; Gordon, J.I. Human Gut Microbes Associated with Obesity. *Nature* **2006**, *444*, 1022–1023, doi:10.1038/4441022a.
215. Wu, Y.; Chi, X.; Zhang, Q.; Chen, F.; Deng, X. Characterization of the Salivary Microbiome in People with Obesity. *PeerJ* **2018**, *6*, e4458, doi:10.7717/peerj.4458.
216. Blasco-Baque, V.; Garidou, L.; Pomié, C.; Escoula, Q.; Loubieres, P.; Le Gall-David, S.; Lemaitre, M.; Nicolas, S.; Klopp, P.; Waget, A.; et al. Periodontitis Induced by *Porphyromonas Gingivalis* Drives Periodontal Microbiota Dysbiosis and Insulin Resistance via an Impaired Adaptive Immune Response. *Gut* **2017**, *66*, 872–885, doi:10.1136/gutjnl-2015-309897.
217. Luche, E.; Cousin, B.; Garidou, L.; Serino, M.; Waget, A.; Barreau, C.; André, M.; Valet, P.; Courtney, M.; Casteilla, L.; et al. Metabolic Endotoxemia Directly Increases the Proliferation of Adipocyte Precursors at the Onset of Metabolic Diseases through a CD14-Dependent Mechanism. *Mol. Metab.* **2013**, *2*, 281–291, doi:10.1016/j.molmet.2013.06.005.
218. Amar, S.; Zhou, Q.; Shaik-Dasthagirisaheb, Y.; Leeman, S. Diet-Induced Obesity in Mice Causes Changes in Immune Responses and Bone Loss Manifested by Bacterial Challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 20466–20471, doi:10.1073/pnas.0710335105.
219. Zuza, E.P.; Garcia, V.G.; Theodoro, L.H.; Ervolino, E.; Favero, L.F.V.; Longo, M.; Ribeiro, F.S.; Martins, A.T.; Spolidorio, L.C.; Zuanon, J.A.S.; et al. Influence of Obesity on Experimental Periodontitis in Rats: Histopathological, Histometric and Immunohistochemical Study. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *22*, 1197–1208, doi:10.1007/s00784-017-2207-y.
220. Diet-Induced Obesity, Gut Microbiota and Bone, Including Alveolar Bone Loss | Elsevier Enhanced Reader Available online: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S000399691730047X?token=C9850F9F7E1B3B8780B3C75E7CA20181893264B647E7C7422FBC8C91CC6A50C5AD49B440EE0657015D207CBAB0F41817&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210907080030 (accessed on 7 September 2021).
221. Fujita, Y.; Maki, K. High-Fat Diet-Induced Obesity Triggers Alveolar Bone Loss and Spontaneous Periodontal Disease in Growing Mice. *BMC Obes.* **2016**, *3*, 1, doi:10.1186/s40608-016-0082-8.

222. Pomié, C.; Blasco-Baque, V.; Klopp, P.; Nicolas, S.; Waget, A.; Loubières, P.; Azalbert, V.; Puel, A.; Lopez, F.; Dray, C.; et al. Triggering the Adaptive Immune System with Commensal Gut Bacteria Protects against Insulin Resistance and Dysglycemia. *Mol. Metab.* **2016**, *5*, 392–403, doi:10.1016/j.molmet.2016.03.004.
223. Fujisaka, S.; Usui, I.; Bukhari, A.; Ikutani, M.; Oya, T.; Kanatani, Y.; Tsuneyama, K.; Nagai, Y.; Takatsu, K.; Urakaze, M.; et al. Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* **2009**, *58*, 2574–2582, doi:10.2337/db08-1475.
224. Murray, P.J.; Allen, J.E.; Biswas, S.K.; Fisher, E.A.; Gilroy, D.W.; Goerdt, S.; Gordon, S.; Hamilton, J.A.; Ivashkiv, L.B.; Lawrence, T.; et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **2014**, *41*, 14–20, doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008.
225. Burcelin, R.; Serino, M.; Chabo, C.; Garidou, L.; Pomié, C.; Courtney, M.; Amar, J.; Bouloumié, A. Metagenome and Metabolism: The Tissue Microbiota Hypothesis. *Diabetes Obes. Metab.* **2013**, *15 Suppl 3*, 61–70, doi:10.1111/dom.12157.
226. Pontzer, H.; Yamada, Y.; Sagayama, H.; Ainslie, P.N.; Andersen, L.F.; Anderson, L.J.; Arab, L.; Baddou, I.; Bedu-Addo, K.; Blaak, E.E.; et al. Daily Energy Expenditure through the Human Life Course. *Science* **2021**, *373*, 808–812, doi:10.1126/science.abe5017.
227. Slomka, V.; Hernandez-Sanabria, E.; Herrero, E.R.; Zaidel, L.; Bernaerts, K.; Boon, N.; Quirynen, M.; Teughels, W. Nutritional Stimulation of Commensal Oral Bacteria Suppresses Pathogens: The Prebiotic Concept. *J. Clin. Periodontol.* **2017**, *44*, 344–352, doi:10.1111/jcpe.12700.
228. Teughels, W.; Newman, M.G.; Coucke, W.; Haffajee, A.D.; Van Der Mei, H.C.; Haake, S.K.; Schepers, E.; Cassiman, J.-J.; Van Eldere, J.; van Steenberghe, D.; et al. Guiding Periodontal Pocket Recolonization: A Proof of Concept. *J. Dent. Res.* **2007**, *86*, 1078–1082, doi:10.1177/154405910708601111.
229. GBD 2017 Oral Disorders Collaborators; Bernabe, E.; Marcenes, W.; Hernandez, C.R.; Bailey, J.; Abreu, L.G.; Alipour, V.; Amini, S.; Arabloo, J.; Arefi, Z.; et al. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J. Dent. Res.* **2020**, *99*, 362–373, doi:10.1177/0022034520908533.
230. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 328 Diseases and Injuries for 195 Countries, 1990-2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Lond. Engl.* **2017**, *390*, 1211–1259, doi:10.1016/S0140-6736(17)32154-2.

PUBLICATIONS ISSUES DE LA THÈSE

diagnostics

MDPI

Article

Obesity Drives an Oral Microbiota Signature of Female Patients with Periodontitis: A Pilot Study

Charlotte Thomas [1,2,3], Matthieu Minty [1,2,3], Thibault Canceill [2,3,4], Pascale Loubières [1,2], Vincent Azalbert [1,2], François Tercé [1,2], Camille Champion [1,2,5], Rémy Burcelin [1,2], Pierre Barthet [2,3], Sara Laurencin-Dalicieux [2,3,6,†] and Vincent Blasco-Baque [1,2,3,*,†]

1 INSERM UMR 1297 Inserm, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Avenue Jean Poulhès 1, CEDEX 4, 31432 Toulouse, France; charlotte.thomas@inserm.fr (C.T.); matthieu.minty@inserm.fr (M.M.); pascale.loubieres@inserm.fr (P.L.); vincent.azalbert@inserm.fr (V.A.); francois.terce@inserm.fr (F.T.); camille.champion@inserm.fr (C.C.); remy.burcelin@inserm.fr (R.B.)
2 Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Paul Sabatier III (UPS), 118 Route de Narbonne, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France; thibault.canceill@sfr.fr (T.C.); barthet_pierre@orange.fr (P.B.); laurencin.s@chu-toulouse.fr (S.L.-D.)
3 Service d'Odontologie Rangueil, CHU de Toulouse, 3 Chemin des Maraîchers, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France
4 UMR CNRS 5085, CIRIMAT, Université Paul Sabatier, 35 Chemin des Maraichers, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France
5 Institut de Mathématiques de Toulouse, Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France
6 INSERM U1295, CERPOP, Epidémiologie et Analyse en Santé Publique, Risques, Maladies Chroniques et Handicaps, 37 Allées Jules Guesdes, 31000 Toulouse, France
* Correspondence: vincent.blasco@inserm.fr; Tel.: +33-56-132-5612; Fax: +33-53-122-4136
† These authors contributed equally to this work.

Citation: Thomas, C.; Minty, M.; Canceill, T.; Loubières, P.; Azalbert, V.; Tercé, F.; Champion, C.; Burcelin, R.; Barthet, P.; Laurencin-Dalicieux, S.; et al. Obesity Drives an Oral Microbiota Signature of Female Patients with Periodontitis: A Pilot Study. *Diagnostics* **2021**, *11*, 745. https://doi.org/10.3390/diagnostics11050745

Academic Editor: Raul Colodner

Received: 11 March 2021
Accepted: 19 April 2021
Published: 21 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: The aim of this study was to analyze the link between oral microbiota and obesity in humans. We conducted a pilot study including 19 subjects with periodontitis divided into two groups: normo-weighted subjects (NWS) with a body mass index (BMI) between 20 and 25 ($n = 9$) and obese subjects (OS) with a BMI > 30 ($n = 10$). Obesity was associated with a poor oral health status characterized by an increased number of missing teeth and a higher score of periodontal-support loss associated with dysbiotic oral microbiota (39.45 ± 3.74 vs. 26.41 ± 11.21, $p = 0.03$ for the Chao 1 index). Oral microbiota taxonomic analysis showed that the abundance of the *Capnocytophaga* genus was higher (2.47% ± 3.02 vs. 0.27% ± 0.29, $p = 0.04$) in OS compared to NWS. Obese females (OF) were characterized by an increase in the *Streptococcus* genus (34.12% ± 14.29 vs. 10.55% ± 10.42, $p = 0.05$) compared to obese males (OM), where the *Neisseria* genus was increased (5.75% ± 5.03 vs. 58.05% ± 30.64, $p = 0.008$). These first data suggest that sex/gender is determinant in the link between oral dysbiotic microbiota and obesity in patients with periodontitis. Our results could lead to recommendations concerning therapeutic strategies for obese patients with periodontitis following the sex/gender.

Keywords: oral microbiota; obesity; periodontitis; dysbiosis; sex/gender

1. Introduction

Obesity is recognized as a major public health problem. According to the World Health Organization, in 2017, 1.9 billion people were considered overweight, of which 650 million were obese which represents 39% of the adult population. In France, the results of the latest national ObÉpi survey conducted in 2012 showed a continuous increase in overweight and obesity among adults over 18 years of age with 15% of obese people, i.e., almost twice as many as in 1997 (8.5%) [1]. This increase is also found in the worldwide population in industrialized countries as well as in regions such as Sub-Saharan Africa

that were considered spared until now. Nowadays, the evolution of this pathology is considered as pandemic with a clear inflammatory character which in turn increases the risk of development of other cardio-metabolic diseases such as hypertension, atherosclerosis, and type 2 diabetes. The causes of obesity are multifactorial and include lifestyle, diet, environment, and genetic factors. However, these etiologies are insufficient to explain its worldwide expansion and new research is required to identify other parameters. Recent data showed that a dysbiotic intestinal microbiota is involved in the development of obesity [2,3] and characterizes obese people [4]. Dysbiosis is defined by a qualitative and quantitative imbalance of the flora that can result in a decrease in bacterial diversity and/or an excess of certain pathogens. Obese people present an increase in the percentage of the Firmicutes phylum (Gram-positive) and a decrease in the Bacteroides phylum (Gram-negative) [5]. Moreover, obese people are also characterized by a dysbiotic oral microbiota with an increased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio [6]. The salivary microbiota contains 10^{10} bacteria and between 300 and 400 different species. Oral dysbiosis leads to an organizational change of this ecosystem that can potentiate the effect of particular species like anaerobic Gram-negative bacteria [7–9]. Interestingly, an increase in these Gram-negative bacteria is also associated with the development of a specific oral pathology: periodontitis. Periodontitis is a non-communicable, chronic inflammatory disease of infectious origin that causes irreversible destruction of the tooth surrounding tissues, ultimately leading to tooth loss [10,11]. The positive association between obesity and periodontal disease has been demonstrated in numerous clinical and epidemiological studies. Obese people were often associated with a lower socio-economic status compared to normo-weighted people. Low socioeconomic status is also associated with poor oral health and an increased risk of developing periodontal diseases [12–14]. Recently, the new classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions (2017 European Federation of Periodontology and American Academy of Periodontology Consensus Report) highlights the predominant role of obesity in periodontal attachment loss via periodontal inflammation [15,16]. Obese people have a higher risk of developing severe periodontitis and, reciprocally, a higher body mass index (BMI) is observed in subjects with periodontitis [17–19]. According to the current literature, several mechanisms support the "bi-directional" relationship between obesity and periodontitis [20]. Some authors have implied that periodontitis and its dysbiotic microbiota may have a link with systemic diseases such as obesity [21–23]. In obese rats, adipose tissue inflammation was significantly aggravated by periodontitis with an increased expression of pro-inflammatory cytokines such as Interleukin-6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor α (TNF-α) [24,25]. Gram-negative oral bacteria and meta-factors, like lipopolysaccharide (LPS), in fatty tissues can induce a chronic, low-grade inflammatory response by macrophages and an increased production of pro-inflammatory adipokines in adipocytes [26]. This inflammatory state causes the proliferation of adipocyte precursors, predisposing to obesity [27].

As in the intestine, salivary dysbiosis can lead to the passage of Gram-negative bacteria or virulence factors through the oral mucosa, resulting in low-grade local and systemic inflammation called metabolic endotoxemia. Bacterial translocation from the mouth occurs via an increase in epithelial intercellular permeability induced by periodontitis. This endotoxemia associated with a chronic immuno-inflammatory reaction may contribute to the development and/or aggravation of metabolic disorders. However, research on the identification of causal oral bacteria species is still scarce. Different proportions of certain bacterial species have been observed, but their causality and mechanisms of action in obesity remain to be clarified. Thus, the link between obesity and dysbiotic oral microbiota needs to be further explored to identify a potential oral microbiota signature in obesity. The principal aim of this study was to analyze the oral microbiota status of obese subjects in relation to periodontitis. For this matter, we set up a pilot cohort study of 19 patients with periodontitis divided into two groups: normo-weighted subjects with a body mass index (BMI) between 20 and 25 (n = 9) and obese subjects with a BMI > 30 (n = 10), with an

equivalent male-female ratio. Our results show that sex/gender plays a role in the oral microbiota signature of obesity in subjects with periodontitis.

2. Materials and Methods

We followed the STROBE statement guidelines for reporting observational studies [28]. The observational study was approved by the Commission Éthique du Département de Médecine Générale de Midi Pyrénées (local medical ethics committee).

2.1. Study Design

We conducted a cross-sectional study between January and February 2020 in Toulouse's Public Teaching Hospital (CHU de Toulouse, France) including patients who were consulting for periodontal reasons. All of the participants gave their informed consent for participation in this study and agreement for an oral examination and saliva sampling for biological analyses.

2.2. Settings

The study was conducted in the Toulouse's Public Teaching Hospital Periodontology consult (CHU de Toulouse, France) by two trained and calibrated investigators (C.T., S.L.-D.). The inclusion was proposed to every patient meeting inclusion criteria between January and February 2020 with no follow-up planed in the field of the study. As this study is non-interventional, the patient's periodontal treatment was not different whether they consented or not to participate.

2.3. Participants

We included in this study adult patients with periodontitis who were able to understand and sign the consent form. In order to explore the differences between normo-weighted people and obese people, we excluded under-weighted patients with a BMI lower than 20 (kg/m^2) and those over-weighted with a BMI between 25 (kg/m^2) and 30 (kg/m^2). We excluded the patients who presented diabetes (in order to purely explore obesity), liver diseases or steatosis (with an etiology of viral infections and autoimmune disease), chronic viral infections (Human immunodeficiency virus (HIV), Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), and mononucleosis), chronic renal failure (creatinine clearance less than 60 mL/min), chronic or acute gastrointestinal diseases, history of gastrointestinal surgery modifying the anatomy, and those who were under anti-diabetic treatment or Proton Pump Inhibitors (PPI) treatment or had taken prebiotics, probiotics, or antibiotics in the month before the inclusion. Pregnant or breastfeeding women and people under guardianship or curatorship were also excluded. The participants were divided into two groups according to their BMI between 20 and 25 or over 30.

2.4. Variables and Data Measurements

The main outcome of this study was to analyze the oral microbiota's taxonomic composition in both obese and normal weighted patients' groups. Sampling was performed during the inclusion consultation which was conducted as following:

2.4.1. Medical and Socio-Demographic Characteristics

Medical and dental history were assessed (associated pathologies, drugs, level of stress scored on a 10-points scale) as well as lifestyle and nutritional behavior of the patients, which were recorded from a questionnaire. This enabled us to focus on oral hygiene habits: frequency of visits to the dental surgeon and frequency and type of materials used (i.e., manual or electric toothbrush, mouthwash, interdental brushes).

2.4.2. Oral Health Characteristics

For each patient, complete oral and periodontal examinations were carried out. A PCP15 probe was used for full-mouth periodontal charting (6 measurements per tooth) to determine probing depth, periodontal attachment loss, bleeding on probing (BOP) index, plaque index (PI), and score of periodontal-support loss in relation to the patient's age and periodontal diagnostic (Stage and Grade). The decay-missing-filled (DMF) index and radiological exam were also conducted. Two qualified periodontists (C.T., S.L.-D.) conducted the oral health examinations. They were calibrated for full-mouth periodontal charting and periodontal assessment (probing depth, periodontal attachment loss, and BOP) before the launch of the study with an overall inter-rater kappa reaching 0.9. Prior to testing, the examiners verified that they had exactly the same protocol for the clinical examination focusing on both caries and periodontal status.

2.4.3. Oral Microbiota Analysis

Unstimulated saliva was extracted and collected into sterile tubes on the day of the oral examination. Samples were then frozen into liquid nitrogen and stored at −80 °C for taxonomic analysis of the oral microbiota. Total DNA was extracted from frozen saliva using a Qiamp Cador Pathogen Mini kit (QIAGEN ref 54106, Les Ulis, France) according to manufacturer's recommendations. Then, hypervariable V2 to V4 regions of the 16S bacterial ribosomal DNA (16S rDNA) were analyzed as previously described [29,30]. The Miseq sequencing of the samples was performed by Vaiomer (Labège, France).

2.5. Data Management and Analysis

2.5.1. Bioinformatics Pipeline

The 16S-targeted metagenomic MiSeq reads from oral samples were analyzed using the bioinformatics pipeline established by Vaiomer (Labège, France) based on the FROGS v1.4.0 tool [31]. Briefly, after demultiplexing of the bar-coded Illumina paired reads, R1 and R2 read sequences were trimmed off, respectively, 10 and 40 bases to remove lower quality bases. Clean reads were paired for each sample independently into longer fragments using FLASH. The resulting amplicons were further cleaned by removing unspecific amplifications, i.e., fragments shorter than 350 and longer than 500 bases or without the two PCR primer sequences (10% mismatches allowed). Operational taxonomic units (OTUs) were produced via single-linkage clustering using the Swarm algorithm v2.1.6 in two passes: the first pass was a clustering with an aggregation distance equal to 1 and the second pass with an aggregation distance equal to 3. The OTUs identified as chimera (with VSEARCH v1.9.5) in all samples in which they were present were removed. The OTUs with abundance lower than 0.005% of the whole dataset abundance were removed. Finally, taxonomic assignment was performed in order to determine community profiles using the Blast+ v2.2.30+ against the Silva 128 Parc databank.

2.5.2. Statistical Analyses

Data were blinded to maintain participant confidentiality. The statistical analyses were corrected with the false discovery rate (FDR), a method of conceptualizing the rate of type I errors in null hypothesis testing when conducting multiple comparisons [32]. The bacterial diversity analyses (Chao1 alpha diversity and Bray–Curtis beta diversity) were performed using the Phyloseq v1.14.0 R package. The differential taxa analyses were conducted with the linear discriminant analysis effect size tool LEfSe [33] using default parameters (alpha parameter significance threshold set to 0.05 and the logarithmic LDA score cutoff set to 2.0). Unpaired Mann–Whitney tests were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A PERMANOVA test was performed with 999 permutations to assess the statistical significance of the difference between groups in beta diversity PCoA analyses (Figures 1D, 2E, and 4E). Next, we performed an exploratory data analysis by using principal component analysis (PCA) to identify which

parameters characterized best the obese and normo-weighted subjects (Figures 1E, 2F, 3, and 4F). Represented among those variables are bacterial groups identified by the cladogram in the oral microbiota and clinical parameters such as sex, BMI, stress, number of decayed, missing and filled teeth, smoking, plaque index (PI) and bleeding on probing (BOP), loss of attachment, and probing depth.

3. Results

3.1. Obese Subjects Present an Increased Periodontal Risk with More Dental Loss, Associated with a Greater Quantity of Capnocytophaga in Oral Microbiota Compared to Normo-Weighted Subjects

As reported in Table 1, the mean age of the subjects was not significantly different between obese and normo-weighted groups: 59.4 years old ± 11.65 with 50% of female (n = 5) in the obese group versus 57.11 years old ± 10.49 with 44% of females (n = 4) in the normo-weighted group. As the selection criterion, mean body weight (91.4 kg ± 9.38) and BMI (30.02 ± 1.48) of obese subjects (OS) were significantly higher than normo-weighted subjects (NWS) (67.33 kg ± 6.93 and 23.11 ± 1.29, respectively, $p < 0.001$ for both). No significant difference between OS and NWS was observed as far as stress score, nutritional behavior, and lifestyle habits were concerned.

Table 1. General and oral parameters between normo-weighted subjects (NWS; n = 9) and obese subjects (OS; n = 10). Data as mean ± SD, * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ unpaired Mann–Whitney test and Fisher test exact. Significant p-values have been highlighted in bold.

Parameters	Normo-Weighted Subjects (NWS) 20 < BMI < 25	Obese Subjects (OS) BMI > 30	p-Value
n	9	10	
Sex (number of women, %)	4 (44.44%)	5 (50%)	>0.99
Age (years)	57.11 ± 10.49	59.40 ± 11.65	0.57
Weight (Kg)	67.33 ± 6.93	91.40 ± 9.38	**<0.001 *** **
Height (cm)	170.56 ± 8.52	168.90 ± 10.17	0.51
BMI (kg/m^2)	23.11 ± 1.29	30.02 ± 1.48	**<0.001 *** **
Smoking (number of smokers, %)	6 (67%)	6 (60%)	0.81
Stress on a scale from 0 to 10 (EVA)	3.78 ± 3.93	4.60 ± 2.50	0.46
Frequency of physical activity	1.39 ± 1.76	2.20 ± 2.97	0.76
Meal time (min)	31.89 ± 8.19	27 ± 4.83	0.09
DMF index	12.89 ± 6.23	14.11 ± 5.84	0.69
Number of decayed teeth	0 ± 0	1.00 ± 1.80	0.07
Number of missing teeth	2.44 ± 2.50	6.00 ± 3.77	**0.03 ***
Number of filled teeth	10.44 ± 4.15	7.11 ± 4.88	0.19
Score of periodontal-support loss in relation to the patient's age	0.72 ± 0.23 (Grade B)	1.03 ± 0.35 (Grade C)	**0.04 ***
Probing depth (mm)	3.72 ± 1.02	3.75 ± 1.25	0.97
Loss of attachment (mm)	4.68 ± 1.29	5.39 ± 2.05	0.74
Plaque index (%)	14.67 ± 14.56	16.80 ± 14.41	0.71
Bleeding on probing (%)	23.00 ± 17.73	34.20 ± 22.16	0.19
Brushing frequency			
Once a day	1(1.11%)	3 (30%)	0.55
2 times a day	7 (77.78%)	5 (50%)	

3 times a day	1 (11.11%)	2 (20%)	
Dental check-up frequency			
Less than once every 2 years	0	1 (10%)	0.72
Once every 2 years	1 (11.11%)	1 (10%)	
Once a year	6 (66.67%)	4 (40%)	
2 times a year	2 (22.22%)	4 (40%)	

To explore the link between obesity and oral health, different clinical parameters were analyzed (Table 1). The decay-missing-filled (DMF) index was similar between obese and normo-weighted subjects (14.11 ± 5.84 vs. 12.89 ± 6.23, $p = 0.69$). However, the number of missing teeth was significantly higher in obese patients (6.00 ± 3.77 vs. 2.44 ± 2.50, $p = 0.03$). Concerning the periodontal status, OS presented a significantly higher score of periodontal-support loss in relation to the patient's age corresponding to periodontitis Grade C (1.03 ± 0.35 vs. 0.72 ± 0.23, $p = 0.04$) compared to NWS (Grade B). Periodontitis Grade C corresponds to the greatest speed of progression of the pathology. Finally, clinical attachment loss (5.39 mm ± 2.05 vs. 4.68 mm ± 1.29, $p = 0.74$), plaque index (16.8% ± 14.41 vs. 14.67% ± 14.56, $p = 0.43$), and bleeding on probing (34.2% ± 22.16 vs. 23% ± 17.73, $p = 0.19$) were not significantly different between OS and NWS.

To evaluate the association between oral microbiota and obesity, we performed a taxonomic analysis of the oral microbiota in both groups (Figure 1 and Supplementary Table S1). The relative abundance of the Flavobacteriaceae family (2.47% ± 3.02 vs. 0.27% ± 0.29, $p = 0.04$) and *Capnocytophaga* genus (2.47% ± 3.02 vs. 0.27% ± 0.29, $p = 0.04$) were higher in OS compared to NWS, and the *Capnocytophaga* genus was the only genus to be present in the Flavobacteriaceae family (Figure 1A,B). *Helicobacter* genus and *Helicobacter pylori* species were not detected in either group in oral microbiota. In addition, no difference was observed for the alpha diversity following the Chao 1 index (32.93 ± 10.45 vs. 30.94 ± 14.16, $p = 0.93$) and the beta diversity ($p = 0.27$) in the oral microbiota between obese and normo-weighted groups (Figure 1C,D).

To explore the interaction between clinical and microbial parameters related to obesity, we performed a multivariate analysis by Principal Component Analysis (PCA) (Figure 1E). We identified a specific cluster for each group of subjects. Pearson's correlation analysis was then performed to estimate the relationships between all the parameters that directly influence the group distribution. The relative abundance of Neisseriaceae was positively and significantly correlated with BOP index. Fusobacteriaceae abundance was positively and significantly correlated with microbiota diversity according to the Chao 1 index. The number of missing teeth and the relative abundance of Flavobacteriaceae were positively and significantly correlated with BMI, and we observed that the closest clinical parameter associated with Flavobacteriaceae was the sex/gender. Thus, we hypothesized a link between the sex/gender and the oral microbiota, and we analyzed the implication of the sex/gender within the group of obese subjects.

3.2. Obese Females Have a Higher Number of Decayed and Filled Teeth Compared to Obese Males Associated with a Dysbiotic Oral Microbiota

Besides the weight and height that were higher in obese males, overall general parameters were similar in both obese females (OF) and males (OM), except for the stress score significantly higher in females (6.40 ± 1.52 vs. 2.8 ± 1.92, $p = 0.01$) (Table 2).

In order to investigate gender-related differences in obese subjects, the oral health status was analyzed. OF had a higher DMF index than OM (18.50 ± 3.11 vs. 10.6 ± 5.12, $p = 0.08$) due to an increase in the number of decayed (2.25 ± 2.21 vs. 0, $p = 0.04$) and filled teeth (11.75 ± 2.50 vs. 3.40 ± 2.07, $p = 0.01$). However, concerning the periodontal status, OM presented seemingly more severe cases of periodontitis measured by the clinical attachment loss (6.10 mm ± 2.60 vs. 4.68 mm ± 1.20, $p = 0.46$), the score of periodontal-support loss in relation to the patient's age (1.16 ± 0.40 vs. 0.90 ± 0.28, $p = 0.24$), the number of

missing teeth (7.2 ± 4.86 vs. 4.80 ± 2.16, $p = 0.59$), the plaque index (21% ± 13.73 vs. 12.6% ± 15.32, $p = 0.34$) and bleeding on probing (BOP) index (49% ± 22.33 vs. 19.4% ± 7.64, $p = 0.07$) compared to OF.

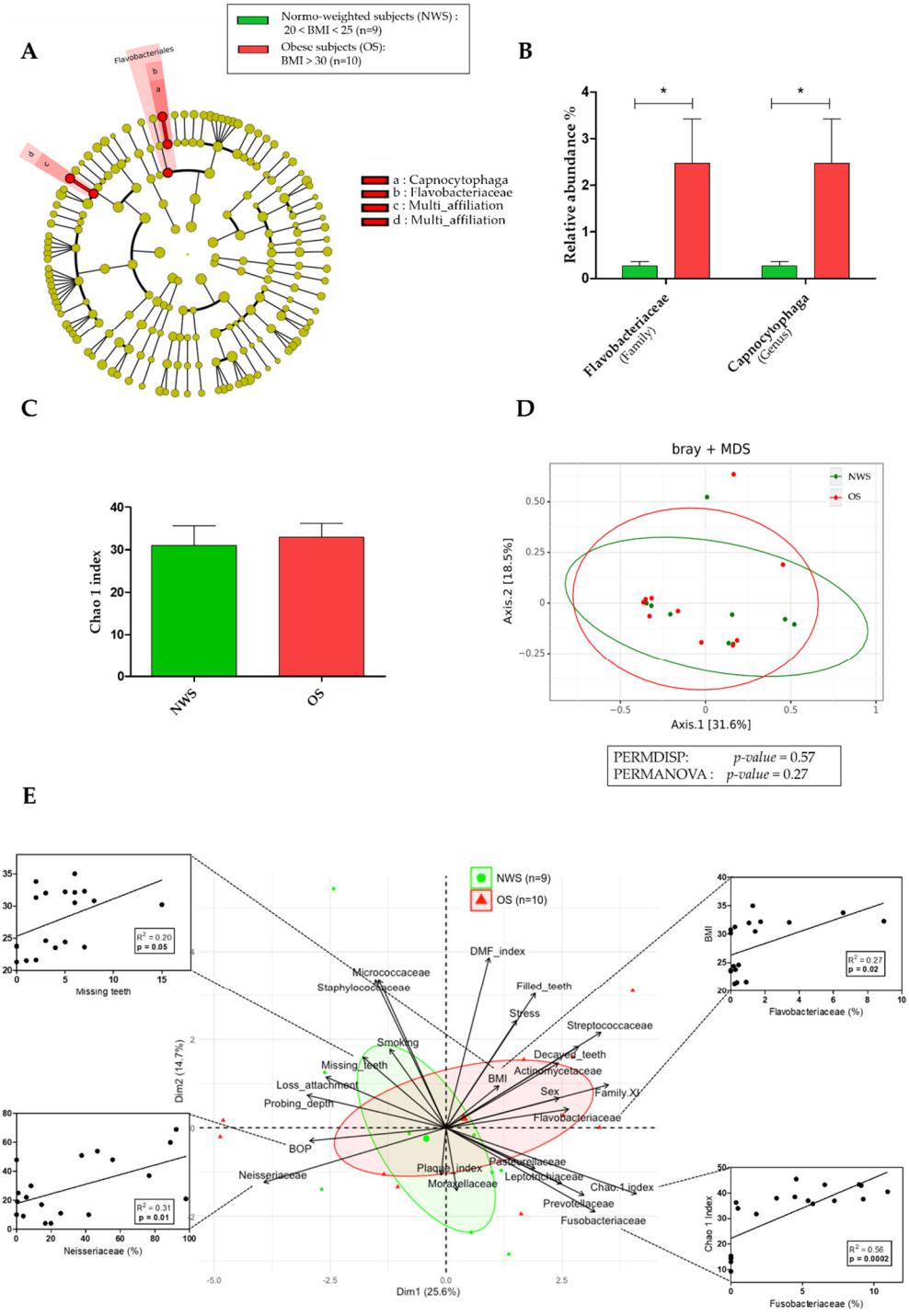


Figure 1. Oral microbiota in obese subjects (OS; $n = 10$) compared to normo-weighted subjects (NWS; $n = 9$). (**A**) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis-based cladogram for oral microbiota; (**B**) Relative abundance (%) for taxonomic family and genus, identified with significant differences in saliva microbiota; (**C**) Chao 1 index representation of alpha diversity; (**D**) Bray–Curtis index representation of the beta diversity between; (**E**) Principal Component Analysis (PCA) between dominant bacterial genera from oral microbiota and oral clinical parameters and Pearson's correlation analysis. Data as mean ± SD, * $p < 0.05$, unpaired Mann–Whitney test.

Table 2. Comparison of general and oral parameters between obese males (OM; $n = 5$) and obese females (OF; $n = 5$). Data as mean ± SD, * $p < 0.05$, unpaired Mann–Whitney test and Fisher test exact. Significant p-values have been highlighted in bold.

Parameters	Obese Males (OM) BMI > 30	Obese Females (OF) BMI > 30	p-Value
n	5	5	
Age (years)	56.80 ± 10.42	62.00 ± 13.41	0.59
Weight (Kg)	96.80 ± 10.26	86.00 ± 4.47	**0.04 ***
Height (cm)	175.60 ± 9.53	162.20 ± 5.45	**0.01 ***
BMI (kg/m^2)	31.32 ± 0.85	32.72 ± 1.73	0.17
Smoking (number of smokers, %)	3 (60%)	3 (60%)	0.90
Stress on a scale from 0 to 10 (EVA)	2.80 ± 1.92	6.40 ± 1.52	**0.01 ***
Frequency of physical activity	2.40± 3.36	2.00 ± 2.91	0.82
Meal time (min)	26.00 ± 6.52	28.00 ± 2.74	0.81
DMF index	10.60 ± 5.12	18.50 ± 3.11	0.08
Number of decayed teeth	0 ± 0	2.25 ± 2.21	**0.04 ***
Number of missing teeth	7.20 ± 4.86	4.80 ± 2.16	0.59
Number of filled teeth	3.40 ± 2.07	11.75 ± 2.50	**0.01 ***
Score of periodontal-support loss in relation to the patient's age	1.16 ± 0.40 (Grade C)	0.90 ± 0.28 (Grade B)	0.24
Probing depth (mm)	4.36 ± 1.48	3.14 ± 0.63	0.20
Loss of attachment (mm)	6.10 ± 2.60	4.68 ± 1.20	0.46
Plaque index (%)	21.00 ± 13.73	12.60 ± 15.32	0.34
Bleeding on probing (%)	49.00 ± 22.33	19.40 ± 7.64	0.07
Brushing frequency			
Once a day	3 (60%)	0	0.16
2 times a day	1 (20%)	4 (80%)	
3 times a day	1 (20%)	1 (20%)	
Dental check-up frequency			
Less than once every 2 years	1 (20%)	0	0.33
Once every 2 years	0	1 (20%)	
Once a year	1 (20%)	3 (60%)	
2 times a year	3 (60%)	1 (20%)	

We then analyzed the oral microbiota in both OF and OM. The relative abundance of many oral bacterial families was significantly higher in OF compared to OM (Figure 2A,B): Actinomycetaceae (3.38% ± 2.10 vs. 0.73% ± 0.62, $p = 0.05$), Corynebacteriaceae (0.57% ± 0.47 vs. 0.02% ± 0.03, $p = 0.01$), Paludibacteriaceae (0.11% ± 0.11 vs. 0.007% ± 0.02, $p = 0.01$), Rikinellaceae (0.08% ± 0.11 vs. 0.001% ± 0.001, $p = 0.009$), Streptococcaceae (34.12% ± 14.29 vs. 10.55% ± 10.42, $p = 0.05$), Family XI (3.44% ± 2.24 vs. 0.91% ± 0.91, $p = 0.03$), Family XIII (0.39% ± 0.43 vs. 0.02% ± 0.03, $p = 0.01$), Veillonellaceae (0.36% ± 0.16 vs. 0.02% ± 0.02, $p = 0.01$), Cardiobacteriaceae (0.11% ± 0.14 vs. 0.01% ± 0.01, $p = 0.01$), and Spirochaetaceae (0.45% ± 0.13 vs. 0% ± 0, $p = 0.02$) (Supplementary Table S2). The Neisseriaceae family was the only one significantly lower in OF compared to OM (6.63% ± 5.27 vs. 58.20% ± 30.47, $p = 0.008$). Higher relative abundance in OF was similarly observed for oral bacterial genera (Figure 2A,C): *Actinomyces* (3.38% ± 2.10 vs. 0.73% ± 0.62, $p = 0.05$), *Corynebacterium* (0.57% ± 0.47 vs. 0.02% ± 0.03, $p = 0.01$), *F*0058 (0.11% ± 0.11 vs. 0.007% ± 0.01, $p = 0.01$), *Parvimonas* (0.40% ± 0.33 vs. 0.006% ± 0.005,$p = 0.01$), *Streptococcus* (34.12% ± 14.29 vs. 10.55% ± 10.42, $p = 0.05$), *Moryella* (0.14% ± 0.24 vs. 0% ± 0, $p = 0.02$), *Filifactor* (0.99% ± 1.18 vs. 0.03% ± 0.03, $p = 0.01$), *Dialister* (0.33% ± 0.15 vs. 0.02% ± 0.02, $p = 0.01$), *Veillonella* (0.02% ± 0.02 vs. 0.001%

± 0.002, $p = 0.009$), *Cardiobacterium* (0.11% ± 0.14 vs. 0.005% ± 0.007, $p = 0.01$), and *Treponema 2* (0.45% ± 0.13 vs. 0% ± 0, $p = 0.02$) (Supplementary Table S2). As for the Neisseriaceae family, the *Neisseria* genus was the only one significantly lower in OF compared to OM (5.75% ± 5.03 vs. 58.05% ± 30.64, $p = 0.008$). Moreover, the alpha diversity was significantly higher in OF compared to OM (39.45 ± 3.74 vs. 26.41 ± 11.21, $p = 0.03$ for the Chao 1 index) (Figure 2D), and the beta diversity was also significantly different ($p = 0.01$) (Figure 2E).

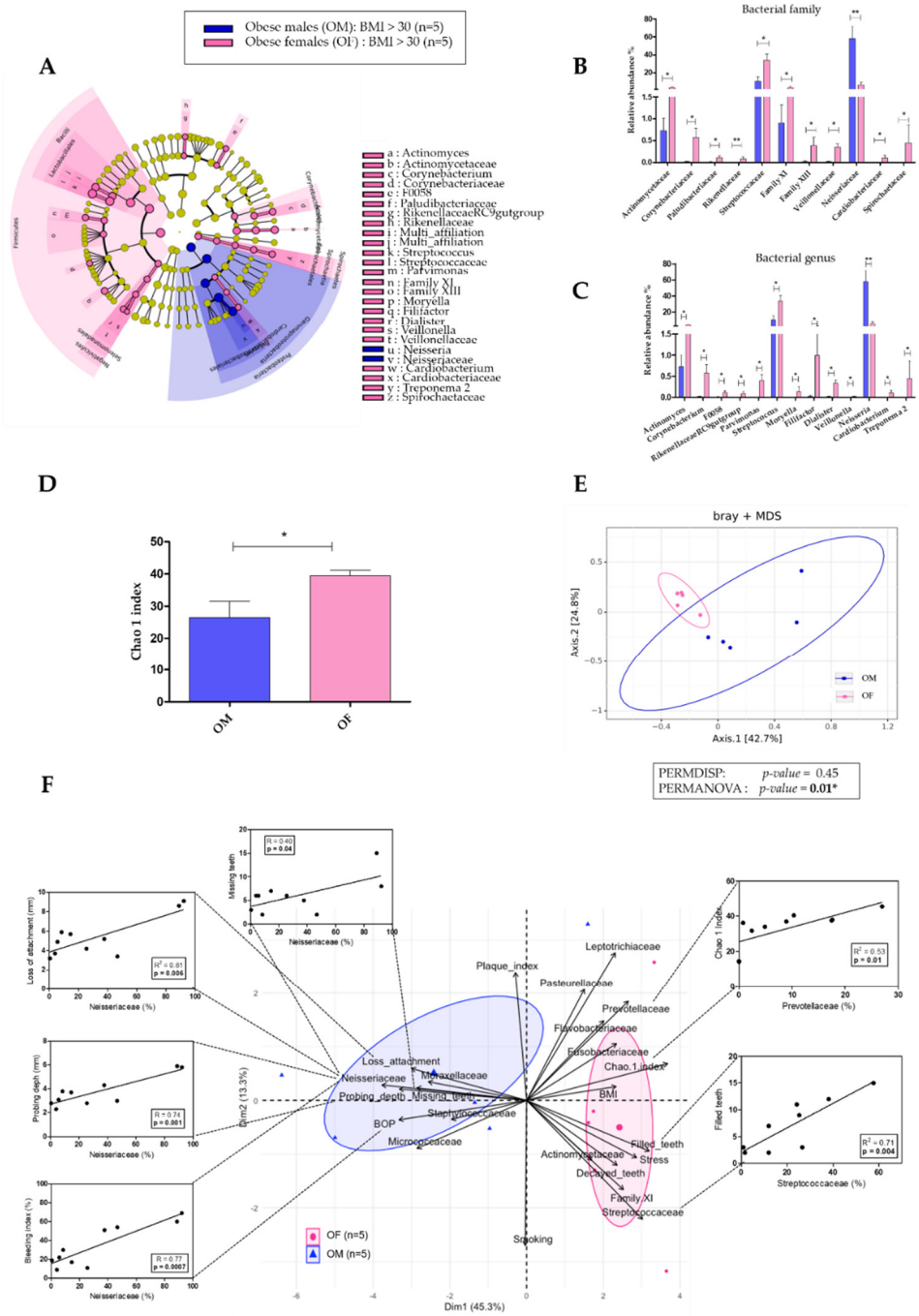


Figure 2. Comparison of oral microbiota between obese males (OM; $n = 5$) and obese females (OF; $n = 5$). (**A**) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis-based cladogram for oral microbiota; (**B**,**C**) Relative abundance (%) for taxonomic family and genus, identified with significant differences in saliva microbiota; (**D**) Chao 1 index representation of alpha diversity; (**E**) Bray–Curtis index representation of the beta diversity between; (**F**) Principal Component Analysis (PCA) and Pearson's correlation analysis between dominant bacterial genera from oral microbiota and oral clinical parameters. Data as mean ± SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, unpaired Mann–Whitney test.

To identify clinical and microbiota parameters associated with sex/gender in obesity, we performed a Principal Component Analysis (PCA) and a Pearson's correlation analysis (Figure 2F). The PCA reported that the relative abundance of Neisseriaceae (key bacterial family in OM) was positively and significantly correlated with parameters determining the periodontal status (number of missing teeth, probing depth, loss of attachment, and BOP index). The relative abundance of Streptococcaceae (a key bacterial family of OF) was positively and significantly correlated with the number of filled teeth.

More interestingly, when performing a Principal Component Analysis (PCA) separating the four groups (normo-weighted males, normo-weighted females, obese males, and obese females), we observed that obese females formed clearly an independent group (Figure 3).

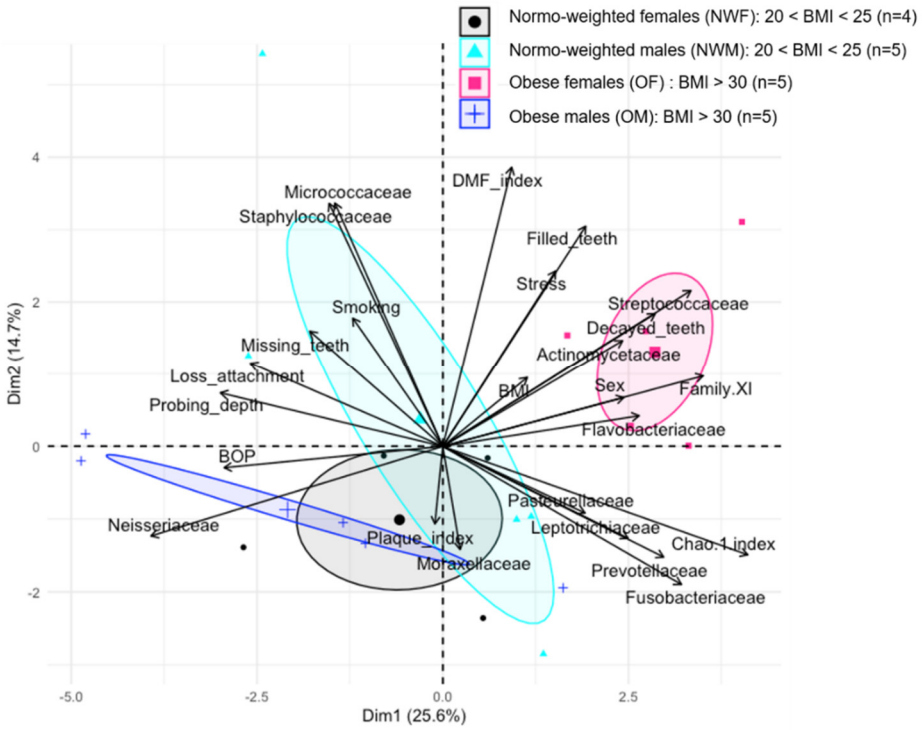


Figure 3. Principal Component analysis (PCA) between dominant bacterial families from oral microbiota and oral clinical parameters in 4 groups: normo-weighted females (NWF; $n = 4$), normo-weighted males (NWM; $n = 5$), obese females (OF; $n = 5$), and obese males (OM; $n = 5$).

3.3. Obesity Is Associated with an Impaired Oral Health and a Dysbiotic Oral Microbiota in Females

When analyzing overall general parameters in normo-weighted females versus obese females, we found no significant differences except for the selection criterion BMI (32.72 ± 1.73 vs. 22.58 ± 1.36, $p = 0.01$) and the mean body weight (86 kg ± 4.47 vs. 61 kg ± 2.45, $p = 0.01$) (Table 3). The DMF index (18.50 ± 3.11 vs. 8 ± 2.16, $p = 0.02$) as well as the number of missing (4.80 ± 2.16 vs. 0.25 ± 0.5, $p = 0.01$) and filled (11.75 ± 2.50 vs. 7.75 ± 1.70, $p = 0.05$) teeth of OF were significantly higher compared to normo-weighted females (NWF). Although no decayed teeth were observed in the normo-weighted group, the higher value in the obese group (2.25 ± 2.21) appeared non-significant ($p = 0.06$). In addition, no significant difference was observed for the other parameters relating to their periodontal status.

Table 3. Comparison of general and oral parameters between normo-weighted females (NWF; n = 4) and obese females (OF; n = 5). Data as mean ± SD, * $p < 0.05$, unpaired Mann–Whitney test and Fisher test exact. Significant p-values have been highlighted in bold.

Parameters	Normo-Weighted Females (NWF) 20 > BMI > 25	Obese Females (OF) BMI > 30	p-Value
n	4	5	
Age (years)	56.00 ± 13.88	62.00 ± 13.41	0.31
Weight (Kg)	61.00 ± 2.45	86.00 ± 4.47	**0.01** *
Height (cm)	164.50 ± 6.76	162.20 ± 5.45	0.62
BMI (kg/m^2)	22.58 ± 1.36	32.72 ± 1.73	**0.01** *
Smoking (number of smokers, %)	3 (75%)	3 (60%)	0.76
Stress on a scale from 0 to 10 (EVA)	5.25 ± 4.27	6.40 ± 1.52	0.62
Frequency of physical activity	1.00 ± 0.82	2.00 ± 2.91	0.89
Meal time (min)	30.00 ± 4.08	28.00 ± 2.74	0.41
DMF index	8.00 ± 2.16	18.50 ± 3.11	**0.02** *
Number of decayed teeth	0 ± 0	2.25 ± 2.21	0.06
Number of missing teeth	0.25 ± 0.50	4.80 ± 2.16	**0.01** *
Number of filled teeth	7.75 ± 1.70	11.75 ± 2.50	**0.05** *
Score of periodontal-support loss in relation to the patient's age	0.75 ± 0.23 (Grade B)	0.90 ± 0.28 (Grade B)	0.38
Probing depth (mm)	4.10 ± 1.24	3.14 ± 0.63	0.26
Loss of attachment (mm)	4.60 ± 1.69	4.68 ± 1.20	0.90
Plaque index (%)	12.00 ±11.22	12.60 ± 15.32	0.90
Bleeding on probing (%)	24.50 ± 18,12	19.40 ± 7.64	0.62
Brushing frequency			
Once a day	1 (25%)	0	
2 times a day	2 (50%)	4 (80%)	0.68
3 times a day	1 (25%)	1 (20%)	
Dental check-up frequency			
Less than once every 2 years	0	0	
Once every 2 years	1 (25%)	1 (20%)	0.71
Once a year	1 (25%)	3 (60%)	
2 times a year	2 (50%)	1 (20%)	

To explore the association between obesity and the oral microbiota in females, we compared microbiota differences between normo-weighted and obese females (Supplementary Table S3). The relative abundance of five oral bacterial families was significantly higher in OF compared to NWF: Actinomycetacea (3.38% ± 2.10 vs. 0.49% ± 0.62, p = 0.03), Corynebacteriaceae (0.57% ± 0.47 vs. 0.04% ± 0.06, p = 0.03), Flavobacteriaceae (3.86% ± 3.66 vs. 0.22% ± 0.15, p = 0.01), Leptotrichiaceae (3.25% ± 2.85 vs. 0.38% ± 0.42, p = 0.01), and Cardiobacteriaceae (0.11% ± 0.14 vs. 0.004% ± 0.003, p = 0.01) (Figure 4A,B). Similarly, the relative abundance of five oral bacterial genera was significantly higher in OF compared to NWF: *Actinomyces* (3.38% ± 2.10 vs. 0.49% ± 0.62, p = 0.03), *Corynebacterium* (0.57% ± 0.47 vs. 0.04% ± 0.06, p = 0.03), *Capnocytophaga* (3.86% ± 3.66 vs. 0.22% ± 0.15, p = 0.01), *Leptotrichia* (3.25% ± 2.85 vs. 0.26 ± 0.35, p = 0.01), and *Cardiobacterium* (0.11% ± 0.14 vs. 0.004% ± 0.003, p = 0.01) (Figure 4A,C). No difference was observed in the alpha diversity between both groups (31.69 ± 15.28 vs. 39.45 ± 3.74, p = 0.55 for the Chao 1 index) (Figure 4D). By contrast, the microbiota beta diversity was significantly different with a close clustering for obese females (p = 0.02) (Figure 4E).

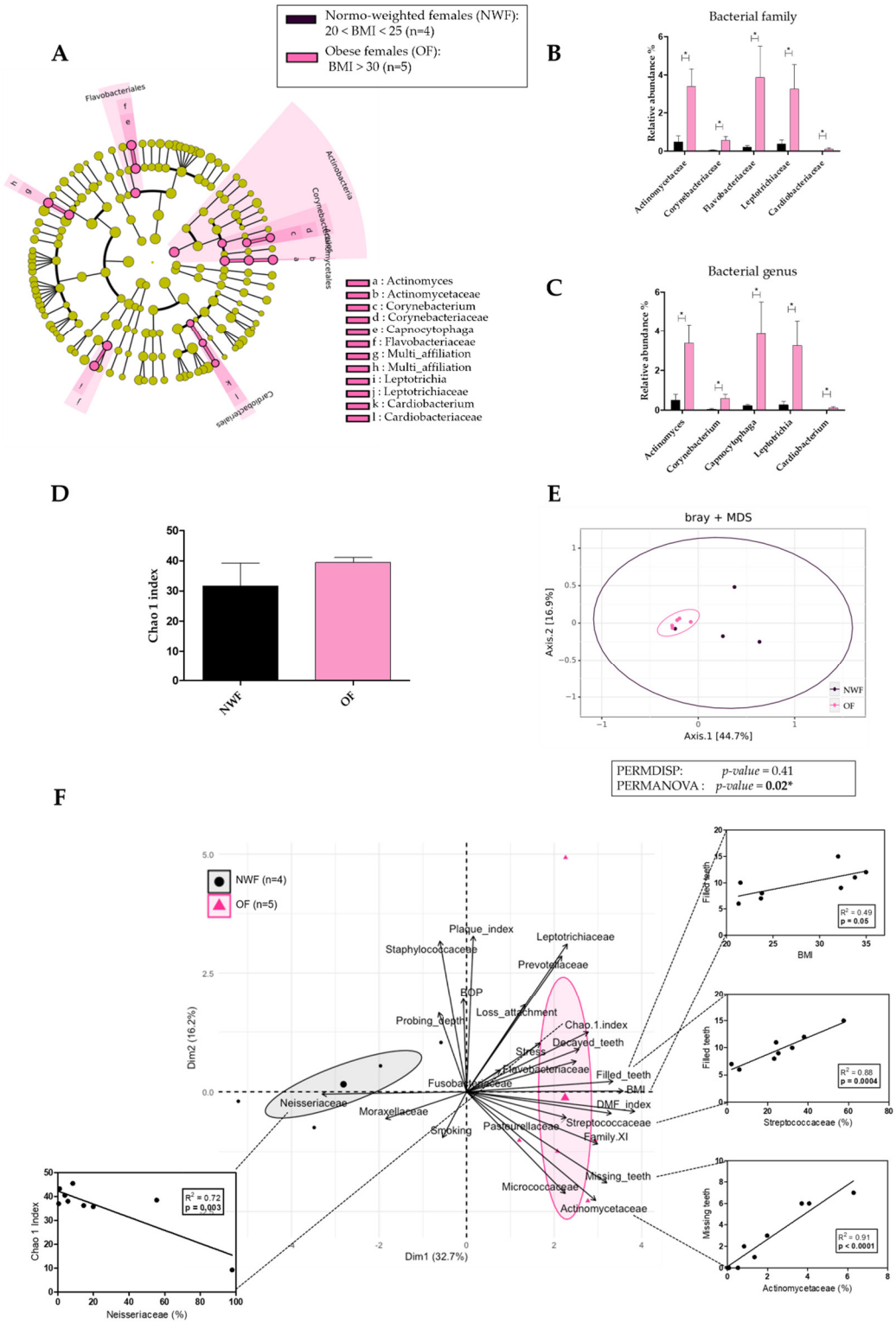


Figure 4. Comparison of oral microbiota between normo-weighted females (NWF; $n = 4$) and obese females (OF; $n = 5$). (**A**) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis-based cladogram for oral microbiota; (**B**,**C**) Relative abundance (%) for taxonomic family and genus, identified with significant differences in saliva microbiota; (**D**) Chao 1 index representation of alpha diversity; (**E**) Bray–Curtis index representation of the beta diversity between; (**F**) Principal Component analysis (PCA) and Pearson's correlation analysis between dominant bacterial genera from oral microbiota and oral clinical parameters. Data as mean ± SD, * $p < 0.05$, unpaired Mann–Whitney test.

To evaluate the link between obesity and all parameters (clinical and microbial) in females, we performed a Principal Component Analysis and a Pearson's correlation (Figure 4F). PCA identified two distinct clusters represented by obese and normo-weighted females. We observed that Actinomycetaceae abundance was positively and significantly correlated with the number of missing teeth. Streptococcaceae abundance and BMI were positively and significantly correlated with the number of filled teeth. Furthermore, Neisseriaceae abundance was negatively and significantly correlated with microbiota diversity according to the Chao 1 index.

4. Discussion

In our study, we showed that obesity is associated with a poor oral health status characterized by the number of missing teeth, score of periodontal-support loss, and an increase in the *Capnocytophaga* genus (Flavobacteriaceae family). In addition, we established a relationship between sex/gender and dysbiotic oral microbiota in obese patients with periodontitis. Among them, obese males were characterized by an overall increase in the *Neisseria* genus associated with a more severe periodontal status compared to obese females, who presented an increase in the *Streptoccocus* genus usually more associated with the development of caries. Smoking is a well-known risk factor for developing periodontitis and oral dysbiosis. However, the significant clinical and microbiological differences presented in our pilot study are seemingly independent of the subject's smoking status, since the proportion of smokers and non-smokers was equivalent in all groups.

Our data confirm evidence found in previous studies indicating that obese subjects present more severe cases of periodontitis than normo-weighted subjects, independently of their oral hygiene habits [17]. A recent study showed that obesity is also associated with a higher risk of tooth loss over five years [34]. In our study, obese subjects had significantly more missing teeth than normo-weighted subjects. Moreover, obese subjects have a greater speed of progression of their periodontitis (Grade C) than normo-weighted subjects (Grade B) with comparable stages [11]. Periodontal grading estimates the risk of developing periodontitis, the progression rate, as well as the frequency of periodontal recalls. Mechanisms supporting the "bi-directional" relationship between obesity and periodontitis have yet to be explored [12]. Obesity, characterized by a chronic low-grade inflammatory state, releases pro-inflammatory mediators from adipose tissues to blood, targeting periodontal tissues. In obese subjects with periodontitis, pro-inflammatory cytokines (Interleukin-1β (Il-1β), Interleukin-6 (Il-6), Tumor Necrosis Factor α (TNF-α)) were found in greater quantities in the blood and also in the crevicular gingival fluid compared to normo-weighted subjects with periodontitis [35,36]. In the crevicular gingival fluid, the level of pro-inflammatory adipokines (leptin, visfatin, and resistin) is also increased in obese subjects [37,38]. The increase of pro-inflammatory cytokines and adipokines in periodontal tissues promotes bone resorption processes caused by the recruitment of immuno-inflammatory cells [39,40]. The alteration of periodontal homeostasis is one of the first steps for shifting towards a dysbiotic oral microbiota, with an increase of Gram-negative bacteria implicated in periodontitis. Gram-negative bacteria disseminate and invade oral tissues through local inflammation.

In our study, we showed that obesity is associated with an overall significant increase of the *Capnocytophaga* genus in obese subjects compared to normo-weighted subjects, especially in obese females. *Capnocytophaga* is a Gram-negative bacteria implicated in periodontitis and it was also found in higher proportion in obese subjects [41]. Others like Wu et al. observed a higher proportion of certain families such as Prevotellaceae and Peptostreptococcaceae in the salivary microbiota of obese people [6]. *Tannerella forsythia* was also found in a higher proportion in obese subjects suffering from periodontitis [7]. However, few studies have explored the oral microbiota in obesity. Interestingly, in our study, both the Prevotellaceace and Tannerellaceae families were found to be more abundant, particularly in obese females. These oral bacteria activate innate immune defenses via Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) recognized by Pattern Recognition

Receptors (PRR) of innate immune cells. PAMPs are represented by different surface molecules such as lipoteichoic acid (Gram-positive specific) or LPS (Gram-negative specific). PRRs include a group of receptors called Toll-Like Receptor (TLR) [42]. TLR-4 (LPS ligand) receptors, present in oral tissues, are involved in the response to oral Gram-negative bacteria. The interaction between TLRs and PAMPs leads to the activation of the MyD88 (Myeloid Differentiation protein 88) signaling pathway and then that of the transcription factor NF-kappa B (NF-kB). This chronic and local inflammatory state could promote systemic and local adipose inflammation through the translocation of live bacteria and bacterial metafactors such as LPS. Bacteria trigger the TLR-4 receptors located on the surface of the adipocytes [25,26,43,44]. In response to bacterial aggression, the secretory profile of adipokine is modified with a decrease in adiponectin (anti-inflammatory adipokine) and an increase in leptin, resistin, and Il-6 (pro-inflammatory adipokines) in adipocytes, increasing the inflammatory status of fatty tissues [26,45,46]. Bacterial translocation in adipose tissues also stimulates the proliferation of pre-adipocytes and macrophages [27].

We also found that obese females with periodontitis were characterized by a specific oral microbiota signature compared to obese males. Our results show that obese males present more severe cases of periodontal disease than obese females. Recent studies on subjects exempt from oral diseases have suggested the involvement of sex/gender in the relationship between obesity and oral microbiota [47]. Other studies confirm this higher prevalence and severity of periodontitis in males compared to females [48,49]. This more advanced periodontal disease is correlated with a significant increase in the abundance of the *Neisseria* genus in obese men. *Neisseria* is a Gram-negative oral bacteria that has been found in higher proportions in obese people [9]. A recent study by De Andrade et al. observed that the *Neisseria* genus was also impacted by sex/gender in obese males [47]. To our knowledge, only one study focused on the composition of oral microbiota of obese females suffering from periodontitis. Their results confirm ours in that they also found an increase in *Capnocytophaga* and *Streptococcus* genera [41]. In our study, obese females also tend to have a more severe carious status which could be correlated with the significant increase in the *Streptococcus* genus [50].

The originality of our study resides in the use of high throughput open-ended sequencing for oral microbiota analysis of patients suffering from periodontitis [51]. Indeed, many studies concerning subjects with periodontitis carry out a targeted microbiological analysis using genomic DNA probes [52]. A limited group of bacteria is then studied. High throughput sequencing overcomes the limitations encountered with DNA probes. It allows characterization, without a priori, of the whole oral microbiota of normo-weighted and obese subjects suffering from periodontitis. New bacterial associations, even with minority species, can be observed, allowing a better understanding of the different bacterial niches and their interactions within the oral microbiota. In our study, we have highlighted an increase of *Capnocytophaga* and *Neisseria* genera which are not considered as major periodontal pathogens. Nevertheless, they are Gram-negative bacteria, capable of translocating in the bloodstream. These opportunistic pathogens can be associated with periodontitis but also with a certain number of infectious diseases [53,54]. The metagenomic sequencing also enabled us to highlight very marked differences in microbiological profiles, particularly between obese and normal-weighted women, despite the low number of subjects. In fact, it will be necessary to confirm and refine the observations of this pilot study with a larger sample.

This study confirms the growing interest to determine the role played by the oral microbiota in obesity and the differences between males and females. Obese patients are at high risk of developing periodontal diseases. It is therefore essential to inform and educate these patients. Establishing healthier environmental measures (physical activity, balanced nutritional intake) associated with more frequent oral check-ups by dental surgeons are to be promoted in order to help limit the development of periodontitis. Moreover, within obesity, the clinical consequences being different between men and women with a greater severity of periodontal disease in males, increased comprehension of this

periodontitis-obesity association will help to develop new targeted therapeutic strategies for the prevention and treatment of obese patients with periodontitis. Considering the patient's profile, including gender, will allow for more personalized individual care.

5. Conclusions

In summary, we conducted a pilot study showing that sex/gender plays a major role in oral dysbiotic microbiota in obese subjects. The *Capnocytophaga* genus seems to emerge in this specific oral microbiota signature. Also, obese females with periodontitis are characterized by an increase of the *Streptococcus* genus compared to males. These results confirm the importance of sex/gender driven by obesity in dysbiotic oral microbiota in females.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found atwww.mdpi.com/2075-4418/11/5/745/s1.

Author Contributions: C.T., M.M., P.L., V.A., P.B., S.L.-D., and V.B.-B. contributed to acquisition data. C.T., T.C., F.T., C.C., and R.B. contributed to analyses and interpretation of data. S.L.-D. and V.B.-B. contributed to conception and design the study and manuscript draft. C.T., M.M., T.C., P.L., V.A., F.T., C.C., R.B., and P.B. critically revised manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Commission Éthique du Département de Médecine Générale de Midi Pyrénées (local medical ethics committee/N°2017-009) the 1th of April 2019.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would also like to show our gratitude to the technical staff of Vaiomer for sequencing and taxonomic analysis for oral microbiota, especially Florence Servant and Anne Deflisque. We thank Adrian Minty for his comments for editing the English.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interest and no conflict of interests.

References

1. Eschwege, E.; Charles, M.; Basdevant, A. ObEpi Enquête Epidémiologique Nationale Sur Le Surpoid et l'obésité. *Inserm, Kanthar Healthe, Roche* 2012. Available online: https://www.roche.fr/content/dam/rochexx/roche-fr/roche_france/fr_FR/doc/AttachedFile_10160.pdf (accessed on 10 May 2020).
2. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* **2006**, *444*, 1027–1031, doi:10.1038/nature05414.
3. Turnbaugh, P.J.; Ridaura, V.K.; Faith, J.J.; Rey, F.E.; Knight, R.; Gordon, J.I. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci. Transl. Med.* **2009**, *1*, 6ra14, doi:10.126/scitranslmed.3000322.
4. Le Chatelier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J.-M.; Kennedy, S.; et al. Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers. *Nature* **2013**, *500*, 541–546, doi:10.1038/nature12506.
5. Ley, R.E.; Turnbaugh, P.J.; Klein, S.; Gordon, J.I. Human Gut Microbes Associated with Obesity. *Nature* **2006**, *444*, 1022–1023, doi:10.1038/4441022a.
6. Wu, Y.; Chi, X.; Zhang, Q.; Chen, F.; Deng, X. Characterization of the Salivary Microbiome in People with Obesity. *PeerJ* **2018**, *6*, e4458, doi:10.7717/peerj.4458.
7. Haffajee, A.D.; Socransky, S.S. Relation of Body Mass Index, Periodontitis and *Tannerella Forsythia*. *J. Clin. Periodontol.* **2009**, *36*, 89–99, doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01356.x.
8. Maciel, S.S.; Feres, M.; Gonçalves, T.E.D.; Zimmermann, G.S.; da Silva, H.D.P.; Figueiredo, L.C.; Duarte, P.M. Does Obesity Influence the Subgingival Microbiota Composition in Periodontal Health and Disease? *J. Clin. Periodontol.* **2016**, *43*, 1003–1012, doi:10.1111/jcpe.12634.

9. Zeigler, C.C.; Persson, G.R.; Wondimu, B.; Marcus, C.; Sobko, T.; Modéer, T. Microbiota in the Oral Subgingival Biofilm Is Associated With Obesity in Adolescence. *Obesity* **2012**, *20*, 157–164, doi:10.1038/oby.2011.305.
10. Chapple, I.L.C.; Mealey, B.L.; Van Dyke, T.E.; Bartold, P.M.; Dommisch, H.; Eickholz, P.; Geisinger, M.L.; Genco, R.J.; Glogauer, M.; Goldstein, M.; et al. Periodontal Health and Gingival Diseases and Conditions on an Intact and a Reduced Periodontium: Consensus Report of Workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.* **2018**, *89*, S74–S84, doi:10.1002/JPER.17-0719.
11. Papapanou, P.N.; Sanz, M.; Buduneli, N.; Dietrich, T.; Feres, M.; Fine, D.H.; Flemmig, T.F.; Garcia, R.; Giannobile, W.V.; Graziani, F.; et al. Periodontitis: Consensus Report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions: Classification and Case Definitions for Periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, S162–S170, doi:10.1111/jcpe.12946.
12. Newton, S.; Braithwaite, D.; Akinyemiju, T.F. Socio-Economic Status over the Life Course and Obesity: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177151, doi:10.1371/journal.pone.0177151.
13. Schuch, H.S.; Peres, K.G.; Singh, A.; Peres, M.A.; Do, L.G. Socioeconomic Position during Life and Periodontitis in Adulthood: A Systematic Review. *Community Dent. Oral. Epidemiol.* **2017**, *45*, 201–208, doi:10.1111/cdoe.12278.
14. Law, C.; Power, C.; Graham, H.; Merrick, D.; Department of Health Public Health Research Consortium. Obesity and Health Inequalities. *Obes. Rev.* **2007**, *8*, 19–22, doi:10.1111/j.1467-789X.2007.00312.x.
15. Albandar, J.M.; Susin, C.; Hughes, F.J. Manifestations of Systemic Diseases and Conditions That Affect the Periodontal Attachment Apparatus: Case Definitions and Diagnostic Considerations. *J. Periodontol.* **2018**, *89* (Suppl S1), S183–S203, doi:10.1002/JPER.16-0480.
16. Jepsen, S.; Caton, J.G.; Albandar, J.M.; Bissada, N.F.; Bouchard, P.; Cortellini, P.; Demirel, K.; de Sanctis, M.; Ercoli, C.; Fan, J.; et al. Periodontal Manifestations of Systemic Diseases and Developmental and Acquired Conditions: Consensus Report of Workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.* **2018**, *89* (Suppl. S1), S237–S248, doi:10.1002/JPER.17-0733.
17. Suvan, J.; D'Aiuto, F.; Moles, D.R.; Petrie, A.; Donos, N. Association between Overweight/Obesity and Periodontitis in Adults. A Systematic Review. *Obes. Rev.* **2011**, *12*, e381–e404, doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00808.x.
18. Khan, S.; Barrington, G.; Bettiol, S.; Barnett, T.; Crocombe, L. Is Overweight/Obesity a Risk Factor for Periodontitis in Young Adults and Adolescents?: A Systematic Review: Obesity and Periodontitis. *Obes. Rev.* **2018**, *19*, 852–883, doi:10.1111/obr.12668.
19. Chaffee, B.W.; Weston, S.J. Association Between Chronic Periodontal Disease and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 1708–1724, doi:10.1902/jop.2010.100321.
20. Jepsen, S.; Suvan, J.; Deschner, J. The Association of Periodontal Diseases with Metabolic Syndrome and Obesity. *Periodontol. 2000* **2020**, *83*, 125–153, doi:10.1111/prd.12326.
21. Saito, T.; Shimazaki, Y. Metabolic Disorders Related to Obesity and Periodontal Disease. *Periodontol. 2000* **2007**, *43*, 254–266, doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00186.x.
22. Hajishengallis, G. Periodontitis: From Microbial Immune Subversion to Systemic Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 30–44, doi:10.1038/nri3785.
23. Saito, T.; Shimazaki, Y.; Koga, T.; Tsuzuki, M.; Ohshima, A. Relationship between Upper Body Obesity and Periodontitis. *J. Dent. Res.* **2001**, *80*, 1631–1636, doi:10.1177/00220345010800070701.
24. Endo, Y.; Tomofuji, T.; Ekuni, D.; Irie, K.; Azuma, T.; Tamaki, N.; Yamamoto, T.; Morita, M. Experimental Periodontitis Induces Gene Expression of Proinflammatory Cytokines in Liver and White Adipose Tissues in Obesity. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 520–526, doi:10.1902/jop.2009.090574.
25. Huang, Y.; Zeng, J.; Chen, G.; Xie, X.; Guo, W.; Tian, W. Periodontitis Contributes to Adipose Tissue Inflammation through the NF-B, JNK and ERK Pathways to Promote Insulin Resistance in a Rat Model. *Microbes Infect.* **2016**, *18*, 804–812, doi:10.1016/j.micinf.2016.08.002.
26. Le Sage, F.; Meilhac, O.; Gonthier, M.-P. Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide Induces Pro-Inflammatory Adipokine Secretion and Oxidative Stress by Regulating Toll-like Receptor-Mediated Signaling Pathways and Redox Enzymes in Adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *446*, 102–110, doi:10.1016/j.mce.2017.02.022.
27. Luche, E.; Cousin, B.; Garidou, L.; Serino, M.; Waget, A.; Barreau, C.; André, M.; Valet, P.; Courtney, M.; Casteilla, L.; et al. Metabolic Endotoxemia Directly Increases the Proliferation of Adipocyte Precursors at the Onset of Metabolic Diseases through a CD14-Dependent Mechanism. *Mol. Metab.* **2013**, *2*, 281–291, doi:10.1016/j.molmet.2013.06.005.
28. Cuschieri, S. The STROBE Guidelines. *Saudi J. Anaesth.* **2019**, *13*, 31, doi:10.4103/sja.SJA_543_18.
29. Minty, M.; Loubières, P.; Canceill, T.; Azalbert, V.; Burcelin, R.; Tercé, F.; Blasco-Baque, V. Gender-Associated Differences in Oral Microbiota and Salivary Biochemical Parameters in Response to Feeding. *J. Physiol. Biochem.* **2020**, doi:10.1007/s13105-020-00757-x.
30. Blasco-Baque, V.; Garidou, L.; Pomié, C.; Escoula, Q.; Loubieres, P.; Le Gall-David, S.; Lemaitre, M.; Nicolas, S.; Klopp, P.; Waget, A.; et al. Periodontitis Induced by Porphyromonas Gingivalis Drives Periodontal Microbiota Dysbiosis and Insulin Resistance via an Impaired Adaptive Immune Response. *Gut* **2017**, *66*, 872–885, doi:10.1136/gutjnl-2015-309897.
31. Escudié, F.; Auer, L.; Bernard, M.; Mariadassou, M.; Cauquil, L.; Vidal, K.; Maman, S.; Hernandez-Raquet, G.; Combes, S.; Pascal, G. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 1287–1294, doi:10.1093/bioinformatics/btx791.
32. Jafari, M.; Ansari-Pour, N. Why, When and How to Adjust Your P Values? *CellJ* **2018**, *20*, doi:10.22074/cellj.2019.5992.

33. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic Biomarker Discovery and Explanation. *Genome. Biol.* **2011**, *12*, R60, doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.
34. Vallim, A.C.; Gaio, E.J.; Oppermann, R.V.; Rösing, C.K.; Albandar, J.M.; Susin, C.; Haas, A.N. Obesity as a Risk Factor for Tooth Loss over 5 Years: A Population-based Cohort Study. *J. Clin. Periodontol.* **2021**, *48*, 15–24, doi:10.1111/jcpe.13378.
35. Zimmermann, G.S.; Bastos, M.F.; Dias Gonçalves, T.E.; Chambrone, L.; Duarte, P.M. Local and Circulating Levels of Adipocytokines in Obese and Normal Weight Individuals with Chronic Periodontitis. *J. Periodontol.* **2013**, *84*, 624–633, doi:10.1902/jop.2012.120254.
36. Zuza, E.P.; Barroso, E.M.; Carrareto, A.L.V.; Pires, J.R.; Carlos, I.Z.; Theodoro, L.H.; Toledo, B.E.C. The Role of Obesity as a Modifying Factor in Patients Undergoing Non-Surgical Periodontal Therapy. *J. Periodontol.* **2011**, *82*, 676–682, doi:10.1902/jop.2010.100545.
37. Boyapati, R.; Chintalapani, S.; Ramisetti, A.; Salavadhi, S.S.; Ramachandran, R. Evaluation of Serum Leptin and Adiponectin in Obese Individuals with Chronic Periodontitis. *Contemp. Clin. Dent.* **2018**, *9*, S210–S214, doi:10.4103/ccd.ccd_1_18.
38. Gonçalves, T.E.D.; Zimmermann, G.S.; Figueiredo, L.C.; de Souza, M.C.; da Cruz, D.F.; Bastos, M.F.; da Silva, H.D.P.; Duarte, P.M. Local and Serum Levels of Adipokines in Patients with Obesity after Periodontal Therapy: One-Year Follow-Up. *J. Clin. Periodontol.* **2015**, *42*, 431–439, doi:10.1111/jcpe.12396.
39. Garlet, G.P. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-Appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 1349–1363, doi:10.1177/0022034510376402.
40. Taylor, J.J. Cytokine Regulation of Immune Responses to Porphyromonas Gingivalis. *Periodontol. 2000* **2010**, *54*, 160–194, doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00344.x.
41. Silva-Boghossian, C.M.; Cesário, P.C.; Leão, A.T.T.; Colombo, A.P.V. Subgingival Microbial Profile of Obese Women with Periodontal Disease. *J. Periodontol*. **2018**, *89*, 186–194, doi:10.1002/JPER.17-0236.
42. Zelkha, S.A.; Freilich, R.W.; Amar, S. Periodontal Innate Immune Mechanisms Relevant to Atherosclerosis and Obesity. *Periodontol. 2000* **2010**, *54*, 207–221, doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00358.x.
43. Akira, S.; Takeda, K. Toll-like Receptor Signalling. *Nat. Rev. Immunol* **2004**, *4*, 499–511, doi:10.1038/nri1391.
44. Rogero, M.; Calder, P. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients* **2018**, *10*, 432, doi:10.3390/nu10040432.
45. Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugus, J.J.; Walsh, K. Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 85–97, doi:10.1038/nri2921.
46. Houstis, N.; Rosen, E.D.; Lander, E.S. Reactive Oxygen Species Have a Causal Role in Multiple Forms of Insulin Resistance. *Nature* **2006**, *440*, 944–948, doi:10.1038/nature04634.
47. de Andrade, P.A.M.; Giovani, P.A.; Araujo, D.S.; de Souza, A.J.; Pedroni-Pereira, A.; Kantovitz, K.R.; Andreote, F.D.; Castelo, P.M.; Nociti-Jr, F.H. Shifts in the Bacterial Community of Saliva Give Insights on the Relationship between Obesity and Oral Microbiota in Adolescents. *Arch. Microbiol.* **2020**, *202*, 1085–1095, doi:10.1007/s00203-020-01817-y.
48. Shiau, H.J.; Reynolds, M.A. Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: Exploring the Biologic Basis. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 1505–1517, doi:10.1902/jop.2010.100045.
49. Shiau, H.J.; Reynolds, M.A. Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: A Systematic Review. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 1379–1389, doi:10.1902/jop.2010.100044.
50. Philip, N.; Suneja, B.; Walsh, L. Beyond Streptococcus Mutans: Clinical Implications of the Evolving Dental Caries Aetiological Paradigms and Its Associated Microbiome. *Br. Dent. J.* **2018**, *224*, 219–225, doi:10.1038/sj.bdj.2018.81.
51. Besser, J.; Carleton, H.A.; Gerner-Smidt, P.; Lindsey, R.L.; Trees, E. Next-Generation Sequencing Technologies and Their Application to the Study and Control of Bacterial Infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 335–341, doi:10.1016/j.cmi.2017.10.013.
52. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Smith, C.; Martin, L.; Haffajee, J.A.; Uzel, N.G.; Goodson, J.M. Use of Checkerboard DNA-DNA Hybridization to Study Complex Microbial Ecosystems. *Oral Microbiol. Immunol.* **2004**, *19*, 352–362, doi:10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x.
53. Nibali, L.; Sousa, V.; Davrandi, M.; Spratt, D.; Alyahya, Q.; Dopico, J.; Donos, N. Differences in the Periodontal Microbiome of Successfully Treated and Persistent Aggressive Periodontitis. *J. Clin. Periodontol*. **2020**, *47*, 980–990, doi:10.1111/jcpe.13330.
54. Thirumala, R.; Rappo, U.; Babady, N.E.; Kamboj, M.; Chawla, M. Capnocytophaga Lung Abscess in a Patient with Metastatic Neuroendocrine Tumor. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 204–207, doi:10.1128/JCM.05306-11.

diagnostics

MDPI

Review

Oral Microbiota: A Major Player in the Diagnosis of Systemic Diseases

Charlotte Thomas [1,2,3,*,†], Matthieu Minty [1,2,3,*,†], Alexia Vinel [1,2,3], Thibault Canceill [2,3,4], Pascale Loubières [1,2], Remy Burcelin [1,2], Myriam Kaddech [2,3], Vincent Blasco-Baque [1,2,3,†] and Sara Laurencin-Dalicieux [2,3,5,†]

1 INSERM UMR 1297 Inserm, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Avenue Jean Poulhès 1, CEDEX 4, 31432 Toulouse, France; alexia.vinel@inserm.fr (A.V.); pascale.loubieres@inserm.fr (P.L.); remy.burcelin@inserm.fr (R.B.); vincent.blasco@inserm.fr (V.B.-B.)
2 Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Paul Sabatier III (UPS), 118 Route de Narbonne, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France; thibault.canceill@sfr.fr (T.C.); myriamkaddech@hotmail.com (M.K.); laurencin.s@chu-toulouse.fr (S.L.-D.)
3 Service d'Odontologie Rangueil, CHU de Toulouse, 3 Chemin des Maraîchers, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France
4 UMR CNRS 5085, CIRIMAT, Université Paul Sabatier, 35 Chemin des Maraichers, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France
5 INSERM UMR 1295, CERPOP, Epidémiologie et Analyse en Santé Publique, Risques, Maladies Chroniques et Handicaps, 37 Allées Jules Guesdes, 31000 Toulouse, France
* Correspondence: charlotte.thomas@inserm.fr (C.T.); matthieu.minty@inserm.fr (M.M.); Tel.: +33-5-61-32-56-12 (C.T. & M.M.); Fax: +33-5-31-22-41-36 (C.T. & M.M.)
† These authors contributed equally to this work.

Citation: Thomas, C.; Minty, M.; Vinel, A.; Canceill, T.; Loubières, P.; Burcelin, R.; Kaddech, M.; Blasco-Baque, V.; Laurencin-Dalicieux, S. Oral Microbiota: A Major Player in the Diagnosis of Systemic Diseases. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1376. https://doi.org/10.3390/diagnostics11081376

Academic Editor: Rosa Del Campo

Received: 15 July 2021
Accepted: 28 July 2021
Published: 30 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: The oral cavity is host to a complex and diverse microbiota community which plays an important role in health and disease. Major oral infections, i.e., caries and periodontal diseases, are both responsible for and induced by oral microbiota dysbiosis. This dysbiosis is known to have an impact on other chronic systemic diseases, whether triggering or aggravating them, making the oral microbiota a novel target in diagnosing, following, and treating systemic diseases. In this review, we summarize the major roles that oral microbiota can play in systemic disease development and aggravation and also how novel tools can help investigate this complex ecosystem. Finally, we describe new therapeutic approaches based on oral bacterial recolonization or host modulation therapies. Collaboration in diagnosis and treatment between oral specialists and general health specialists is of key importance in bridging oral and systemic health and disease and improving patients' wellbeing.

Keywords: oral microbiota; systemic disease; dysbiosis; periodontitis; endotoxemia; inflammation

1. Introduction

The oral cavity is host to a complex microbial group, the oral microbiota, composed mainly of bacteria but also includes viruses, protozoans, fungi, archaea, phages, and ultra-small bacteria belonging to the candidate phyla radiation group [1–3]. Oral microbiota, developed from the first minutes of a child's life, is composed of more than 500 different bacterial species [4,5]. Its exact composition varies greatly from one individual to another as it depends on several factors, such as age, diet, and lifestyle habits (such as smoking and physical activity) [6]. Present in a physiological state, these bacteria cohabit with the human body in a state of symbiosis. There are two equilibriums; one between the proliferation of the different species and the immune capacities of the host and the other, between the bacterial species themselves. In the event of dysbiosis, i.e., a breakdown in this homeostasis, one or more types of microorganisms proliferate and take over—at least temporarily—the immune system [7]. Various oral pathologies can then occur and will

depend on the type of bacterial imbalance [8]. However, the oral microbiota does not only have a local function. We now know that our mouth, through its microbiota, communicates intensely with our whole body [3]. Indeed, oral dysbiosis causes a localized inflammatory state in the oral sphere that can contribute to the maintenance of chronic low-grade systemic inflammation [9]. This can lead to the development or aggravation of systemic pathologies, sometimes with a significant degree of morbidity. The identification of bacteria responsible for these relationships between the oral cavity and the rest of the body is therefore of major interest. The oral microbiota thus becomes a marker of our general health via its systemic activity. The aim of this review is to describe the role of oral microbiota and its bacterial effectors on our general health. The oral cavity and its microbiota play an important role in the diagnosis of an individual's health status and may also give rise to new preventive and therapeutic approaches [10].

2. Oral Microbiota

The oral cavity is the second-largest microbiota reservoir in the body and has been the subject of intense study for several years [11]. The accessibility of the site has made the oral microbiota one of the best-known bacterial communities in the human body, with more than 500 different species identified in adults. Even if the maternal microbiota already plays an important role in the neurodevelopment of the fetus before birth [12,13], the acquisition of the microbiota begins in the first minutes of life through direct contact with the maternal microbiota (skin, vagina, and mouth) [14]. The child's environment is also essential to the construction of its microbiota which is not solely acquired through heredity [4].

The different ecological niches that make up the oral microbiota consist mainly of hard and soft tissues [15,16]. Saliva has a major influence on the oral microbiota and participates in maintaining oral homeostasis [17]. It is essential in mechanical cleansing, has a buffering power to maintain a physiological pH and antimicrobial properties through its various non-specific immune components (immunoglobulin A, lysozyme, lactoferrin, peroxidase system, histidine-rich proteins, etc.). The composition of saliva plays a determining role on the microbiota through a cascade of mechanisms linked to the molecules in suspension, which condition the composition of the biofilm. The latter allows the attachment of bacteria to oral surfaces. Salivary components such as glycoproteins are a source of nutrition to ensure the growth of bacteria present in the mouth [17,18]. All these bacteria act synergistically, at very low concentrations, allowing a complex balance between the surrounding microbiota and the host's oral cavity. An insufficient salivary flow can easily lead to dysbiosis.

Bacteria are present in the mouth in two forms: either in a planktonic state, as in saliva, or in a biofilm as in the dental plaque. Bacteria present in planktonic form circulate freely in the oral environment, whereas dental plaque is the result of the heterogeneous accumulation of aerobic and anaerobic bacteria that form an adherent deposit on the surface of teeth and oral mucosa [19]. Dental surfaces are covered with an organic film called the Acquired Exogenous Pellicle (AEP), which protects teeth from mechanical and acidic aggressions but can also condition the tooth surface to promote further attachment of bacteria as part of the biofilm developmental process. Indeed, the planktonic bacteria present in saliva can adhere to the AEP in a reversible way by electrostatic and Van Der Waals forces or in an irreversible way by ionic or covalent bonds. The first step in the creation of a biofilm is the irreversible adhesion of pioneer bacteria such as *Streptococcus gordonii, Streptococcus oralis,* or *Streptococcus mitis* to the AEP, which then proliferates. Secondly, these pioneer bacteria allow the aggregation of new bacteria called late or secondary colonizers [20]. As the biofilm matures, an equilibrium is created between each bacteria present. Microbial dysbiosis can occur due to local and systemic diseases resulting in a gradual shift toward bacteria with specific profiles.

Oral microbiota dysbiosis is at the origin of two major oral pathologies: caries and periodontitis. However, these two pathologies have different profiles [7]. Caries are

responsible for the destruction of the tooth's hard tissues. They are caused by salivary dysbiosis (reduction of the bacterial diversity) resulting from a disturbed supra-gingival biofilm associated with an excess of sugar consumption and/or poor oral hygiene (factors of dysbiosis). This imbalance leads to a modification in the biofilm composition characterized by an increase in Gram-positive bacteria and acidification of the medium [21,22]. The main pathogens increased are *Streptococcus mutans*, *Actinomyces, and Lactobacillus*. *Bifidobacterium spp, Scardovia spp,* and *Candida albicans* are also found in greater quantities [23–25]. This increased acidification is accompanied by a loss of diversity and a reduction in the level and metabolic activity of beneficial bacteria, which prefer to grow at neutral pH. Periodontitis is an oral disease resulting from periodontal dysbiosis associated with a deleterious immuno-inflammatory reaction of the host, leading to the progressive and irreversible destruction of the dental attachment system (the periodontium) and ultimately causing tooth loss. In contrast to the rest of the oral cavity, the microorganisms that develop in the sulcus and adhere to the root surface evolve in an environment that is less rich in oxygen and more protected from shear forces than those found at the supra-gingival level. Periodontal dysbiosis is characterized by an increase in the proportion of Gram-negative anaerobic bacteria historically described in 1979 as belonging to Socranski's "red complex": *Treponema denticola* (*Td*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), and *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) [26]. *Prevotella intermedia (Pi), Dialister spp,* and *Selenomonas spp* are also found in abundance in periodontitis, and the high number of spirochetes seems to be associated with the severity of periodontal destruction [27–30]. However, metagenomic sequencing has made it possible to highlight new concepts concerning periodontal dysbiosis associated with periodontitis. This dysbiosis is the result of a qualitative and quantitative modification of a polymicrobial community, including commensal and pathogenic bacteria [31]. At the periodontal level, dysbiosis comes more from a change in dominant species than from de novo bacterial colonization. Contrary to what is found at the intestinal level, periodontitis is associated with an increase in the diversity of its microbiota [32–34]. This greater diversity is thought to be the result of the additional nutrient supply from the destruction of surrounding tissues and the physical increase in the size of the periodontal pocket lesion [7,28].

3. Physiopathologic Mechanisms of Dysbiotic Oral Microbiota and Systemic Inflammation during General Diseases

Recent data from the scientific literature suggest that there is a link between the development and/or aggravation of certain systemic pathologies and the occurrence of an imbalance in the oral flora [7]. These diseases have in common a pathophysiological mechanism based on the maintenance of a systemic inflammatory state (low-grade inflammation) whose resolution or stabilization is not possible in the presence of dysbiosis in the oral microbiota. Some authors also suggest that dysbiotic oral microbiota-causing microorganisms could circulate systemically or release part of their constituents into the bloodstream and thus cause complications away from their original site of proliferation. Bacterial meta factors are all the bacterial parts that have an activity of either virulence or activation of the immune system during physiology and physiopathology (for example, lipopolysaccharide (LPS), Flagellin, and teichoic acid). One of the main mediators of this immuno-inflammatory disorder is LPS, which is an endotoxin and a major virulence factor of Gram-negative bacteria. LPS is an example since it is likely to migrate to different organs (liver, muscles, heart, etc.) and trigger inflammatory reactions there [35]. Indeed, bacteria or their components, such as LPS present on the outer membrane of Gram-negative bacteria, are a continuous source of inflammation and infection which cross the epithelial barrier, arrive in the bloodstream, and reach various organs of the body. The main cause of this bacterial translocation is oral microbiota dysbiosis. That is to say, a loss of the balance of the salivary bacterial composition due to an excess of Gram-negative or Gram-positive bacteria or virulence factors (LPS, Flagellin, teichoic acid). Oral bacteria or

meta factors activate innate immune defenses via Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) recognized by Pattern Recognition Receptors (PRR) of innate immune cells. PAMPs are represented by different surface molecules such as teichoic acid (Gram-positive specific) or LPS (Gram-negative specific). PRRs include a group of receptors called Toll-Like Receptor (TLR) [36]. The interaction between TLRs and PAMPs leads to the activation of the MyD88 (Myeloid Differentiation protein 88) signaling pathway and then that of the transcription factor NF-kappa B (NF-kB), inducing a generalized inflammatory response with the synthesis of a variety of pro-inflammatory mediators, such as Tumor Necrosis Factor α (TNF-α) and interleukins.

Figure 1 represents the different possible pathways (by bacterial translocation in the blood) responsible for an increase in pro-inflammatory cytokines in systemic diseases resulting from oral microbiota dysbiosis. The transduction of an inflammatory signal to the nucleus of cells requires a succession of phosphorylation chain reactions catalyzed by protein kinases. Activation of the inflammasome is carried out according to several pathways, those of MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), IKKs (Inhibitor of Kappa B Kinases), and those of JAK/STAT (Janus Kinase and Signal Transducers and Activators of Transcription). The dissemination throughout the body of these oral bacteria or their components (LPS) is at the origin of a modification of the bacterial balance and, therefore, the microbiota of other organs. Several studies have shown other ways of translocation of these oral bacteria by different processes such as ingestion (intestinal microbiota), inhalation (pulmonary microbiota), or sexual intercourse (vaginal microbiota). This shows the link between the oral microbiota and the different microbiota of the organism at the origin of various systemic pathologies described below.

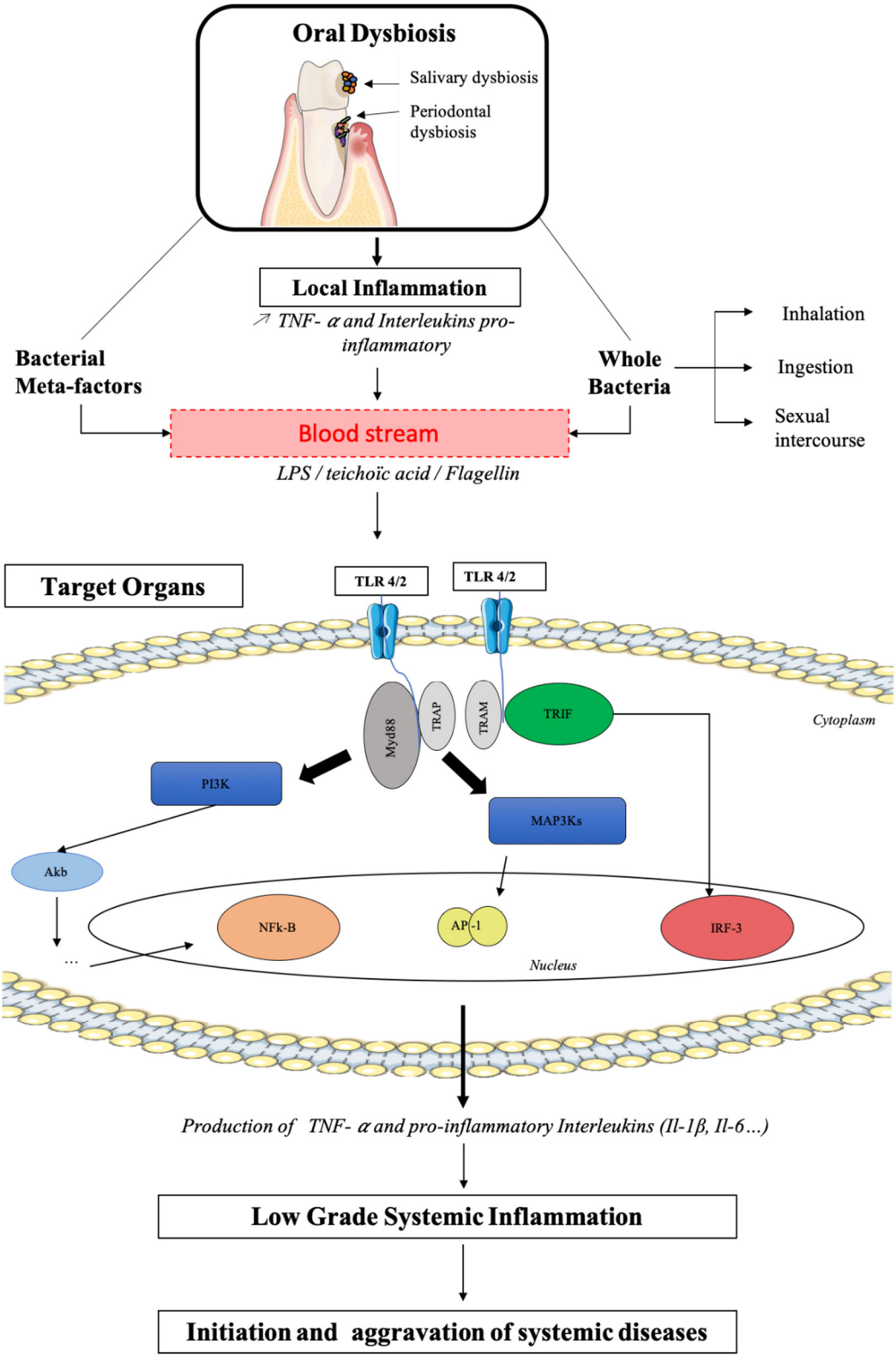


Figure 1. Possible physiopathological mechanisms linking oral dysbiosis to systemic diseases.

In fact, oral microbiota and its balance play a major role in an individual's general homeostasis. Any disruption leads to an increase in certain bacterial species, especially Gram-negative ones, associated with the massive production of pro-inflammatory cytokines, which causes or maintains chronic low-grade inflammation. In this review, we discuss the role that dysbiotic oral microbiota may have on different systemic pathologies:

metabolic diseases, cardiovascular diseases, respiratory diseases, rheumatoid arthritis, adverse pregnancy outcomes, inflammatory bowel diseases, Alzheimer's disease, autism spectrum disorders, and oral mucosal diseases (Figure 2).

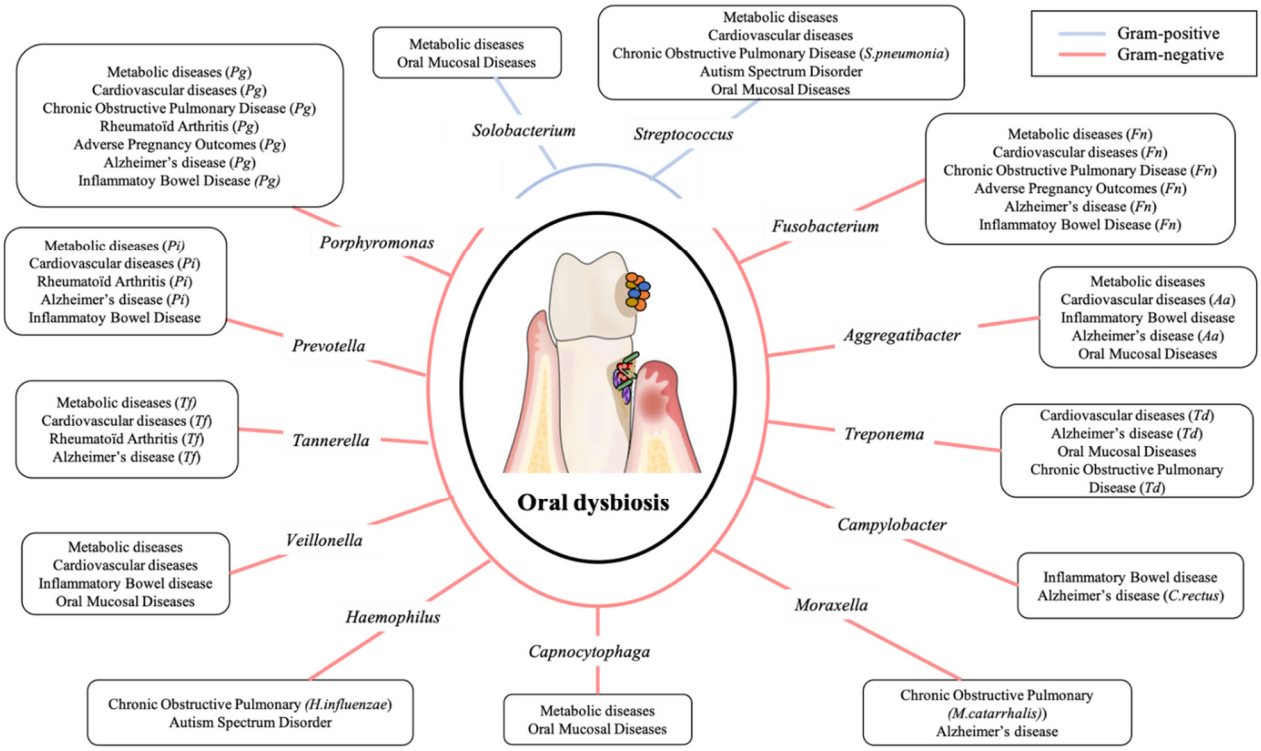


Figure 2. Principal oral pathogens implicated in systemic diseases.

3.1. Metabolic Diseases

Many pathologies are likely to be influenced by this low-grade inflammation. Most of them are represented by the so-called metabolic diseases, which affect the cellular functions of energy production and storage, or even in a broader sense by the "metabolic syndrome" (MetS). This corresponds to a combination of at least three manifestations among obesity, hypertriglyceridemia, high blood pressure, hyperglycemia, and reduced levels of high-density lipoproteins (HDL). Many studies have investigated the role of oral microbiota in these metabolic diseases [37]. At the epidemiological level, there is a positive association between periodontal disease and metabolic pathologies: patients with MetS have a higher risk of developing periodontitis; conversely, patients with periodontitis have a higher risk of suffering from MetS [37–39]. However, the molecular and microbiological mechanisms responsible for these clinically identified associations are still poorly understood [40,41]. The local inflammation associated with oral dysbiosis contributes to maintaining/aggravating a significant metabolic, inflammatory state throughout the body [37] and can cause insulin resistance, inflammation, vascular, and metabolic disorders. Conversely, the lack of recovery from metabolic symptoms maintains the pathological state at the oral level [42].

Diabetes is the metabolic disease whose relationship with oral microbiota has been the most extensively explored. Diabetes is a chronic metabolic disorder defined by fasting hyperglycemia and is due to a deficit in insulin secretion by pancreatic β-cells of autoimmune origin for type 1 diabetes (T1D) or decompensated insulin resistance for type 2 diabetes (T2D) [43,44]. In 2019, the number of people diagnosed with diabetes worldwide was 463 million, or 6% of the world's population. Interestingly, 80% of T2D could be avoided with a healthier diet and regular exercise [45]. However, in recent years, despite the management of these risk factors, the number of diabetics continues to rise, suggesting that there are other risk factors for diabetes, such as oral and gut dysbiosis [46,47].

The bidirectional link between diabetes and periodontitis has been demonstrated with inflammation as a common mediator [48], making periodontitis the sixth complication of T2D [49] and also suggesting that the "motor" of this pathology could be chronic low-grade inflammation [50], which is itself the result of oral microbiota dysbiosis. Differences in the oral and periodontal microbiota were found in diabetic subjects compared to healthy subjects [44,47,51]. A significant increase in the genera *Aggregatibacter, Neisseria, Gemella, Eikenella, Selenomonas, Actinomyces, Capnocytophaga, Fusobacterium, Veillonella,* and *Streptococcus* was observed in people with diabetes [47,52]. In addition, the involvement of oral pathogens such as *Pg* has been demonstrated in insulin resistance [53]. Indeed, high levels of TNF-α and Interleukin-6 (IL-6) (produced by periodontal macrophages in the presence of *Pg*) increase the permeability of the epithelial barriers of the oral cavity [54] and thus favors the passage of Gram-negative bacteria and their virulence factors such as LPS into the bloodstream. In addition to the inflammatory state this causes in the organs, LPS are also responsible for inhibiting the transduction of insulin receptor-initiated signaling pathways and thus the development of insulin resistance [55]. Furthermore, periodontal treatment could reduce glycated hemoglobin (HbA1c) levels by up to 0.4% in T2D patients [56]. Also, oral microbiota can influence the progression of diabetes [57], and some oral hygiene measures, such as overuse of mouthwashes, can even have a detrimental effect on the progression of diabetes [58]. Nonetheless, many mechanisms on this two-dimensional interaction still remain to be elucidated.

The link between gut microbiota and obesity is already established, and numerous studies now focus on the link with the oral microbiota [59–62]. Literature has described that, as with the intestinal microbiota, there is a modification of the oral microbiota in obese people with an increased Firmicute/Bacteroides ratio [63]. Several authors have found differences in the composition of the oral microbiota between obese and normal-weighted subjects with a particular increase in certain genera and species in obese subjects: *Peptostreptococcus, Solobacterium, Selenomonas noxia, Pg, Pi,* and *Tf* [63–67]. Recently we showed that obese people present an increased periodontal risk associated with an increase of *Capnocytophaga* present in the oral microbiota. Moreover, we showed that sex/gender plays a role in the oral microbiota signature of obesity in subjects with periodontitis: obese females were characterized by an increase in the *Streptococcus* genus compared to obese males, where the *Neisseria* genus was increased [68]. Even if the positive association between obesity and periodontitis has been demonstrated in numerous clinical and epidemiological studies, the causal link between oral microbiota and obesity remains to be clarified. Finally, obesity could lead to dyslipidemia and high blood pressure, which in return induce cardiovascular diseases.

3.2. Cardiovascular Diseases

According to the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases (CVD) are the first cause of death worldwide, and deaths from cardiovascular and circulatory diseases are continuously rising, partly due to population growth and aging [69,70]. An estimated 17.9 million deaths per year are attributable to cardiovascular diseases, or 32% of global mortality [71]. There are many risk factors for cardiovascular diseases such as gender, age, smoking, dyslipidemia, hypertension, insulin resistance, and overweight and obesity [71–73]. However, despite the management of these factors, the mortality rate continues to rise associated with inter-individual variability in the risk of unexplained cardiovascular mortality and morbidity, which leads to the search for new risk factors. An increasingly studied risk factor is the immuno-inflammatory axis [74], and oral microbiota dysbiosis is a major risk factor in the development of cardiovascular disease [75].

One of the main causes of cardiovascular disease is the development of atherosclerosis under the influence of environmental and genetic factors. Atherosclerosis results from the accumulation of low-density lipoproteins (LDL) in the vascular wall, where they undergo oxidation, causing endothelial dysfunction [76]. Endothelial cells then allow the

transmigration of circulating inflammatory cells, monocytes, that differentiate into macrophages within the subendothelial space where they phagocyte the oxidized LDL, becoming foamy cells. Then, nearby vascular smooth-muscle cells migrate to the lesion site and synthesize a protein matrix, forming a fibrous cap above the thrombogenic lipidic core. The more the plaque grows, the narrower the vessel lumen becomes, and in case of plaque rupture, the exposed lipidic core activates platelets leading to a thrombus able to block the blood flow in situ or downstream completely. Atherosclerosis is thus the main cause of myocardial infarction, coronary heart disease, stroke, and peripheral artery disease [76].

The first to raise the link between myocardial infarctions and poor oral health were Mattila et al. in 1989 [77]. Since then, numerous studies have concluded a positive association between periodontal diseases and CVD independently of their common risk factors (smoking, age, diabetes) [75,78–81]. Moreover, periodontal treatment has been shown to have beneficial effects on cardiovascular biochemical parameters such as endothelial function and C-Reactive Protein (CRP) levels [82–85]. The mechanisms linking periodontitis and CVD are both direct, via bacterial invasion, and indirect, via inflammation. Indeed, several periodontal pathogens have been identified in the atheromatous plaque, such as *Pg*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Tf*, *Pi*, *Td*, and *Fn*, [86–91]. Koren et al. have demonstrated the presence of oral bacteria DNA (*Chryseomonas*, *Veillonella*, and *Streptococcus*, mainly) on samples of atheromatous plaques and were able to establish a correlation between the measured quantity of some of these DNAs and the significant quantity of the corresponding bacteria in the oral cavity of patients [92]. *Pg* DNA has also been detected in the cardiac valves of patients with CVD and deep periodontal pockets and even in healthy vascular tissues. *Pg* is the most abundant specie in patients with atherosclerosis after bypass surgery [93,94]. In vivo studies showed that the administration of periodontal pathogens to different mice models has notable vascular effects: increased vascular reactivity, smooth muscle cells proliferation and aortic plaque development with *Pg* [95–97], arterial invasion and reduced nitric oxide levels with *Td* [98], higher levels of inflammatory cytokines such as IL-6 and CRP, LDL and atherosclerotic lesion progression with *Fn* [99]. Moreover, polymicrobial infection with *Pg*, *Td*, *Tf*, and *Fn* is associated with accelerated atherosclerosis in vivo [100,101]. Recent studies showed that *Pg* is able to increase vascular permeability and cause vascular damages via, respectively, its outer membrane vesicles and surface-expressed gingipains in vitro and in vivo in a zebrafish model [102]. Also, Pussinen et al. found that coronary heart disease is more common in people who have anti-*Pg* antibodies compared to those who do not, suggesting that periodontal infection or the host's response to anti-*Pg* infection could play a role in the pathogenicity of coronary heart disease [103,104].

The second mechanism linking periodontitis and CVD involves the increased inflammatory cytokines systemic levels occurring in both pathologies. The high levels of Interleukin-1β (IL-1β), IL-6, Interleukin-8 (IL-8), TNFα, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) associated with periodontitis can induce a rapid hepatic synthesis and secretion of plasmatic vascular proteins such as CRP and fibrinogen [105,106]. LPS produced by periodontal pathogens and released in the blood flow triggers an immunological response which, when associated with CRP and fibrinogen, may initiate atherosclerosis by acting on endothelial cells, lipid metabolism modulators, and enhancing oxidative stress [107,108]. LPS is transported and eliminated from the bloodstream by lipoproteins. It is associated with healthy people with HDL present, which helps in its neutralization in case of infection. When HDL levels decrease sharply, it mainly associates with VLDL (Very Low-Density Lipoproteins) [75,109]. LPS associated with VLDL crosses the barrier of endothelial cells to the intima, causing an alteration of lipid homeostasis. VLDL also potentiates the expression of TNF-α and MCP-1 by macrophages resulting in their activation [109]. This systemic response leads to an increase in the production of cytokines associated with an alteration in lipid metabolism. Patients with a lipoprotein profile predominantly

consisting of small, dense LDL are three to seven times more likely to have a cardiovascular event than people with "normal" lipoprotein profiles. Studies have shown that periodontal infections could be correlated with this type of lipid profile [110].

In addition, dyslipidemia is more common in patients with periodontitis. It manifests itself by an increase in the levels of LDL and plasma triglycerides with, conversely, a decrease in HDL. A study has shown that patients with moderate periodontitis do not show quantitative but qualitative changes in LDL because there is an increase in VLDL as previously described [111]. In addition, the elevated levels of cholesterol and LDL noted in the bloodstream of patients with atherosclerosis have been positively correlated with the proliferation of *Fusobacterium* in the microbiota of their oral cavity [92].

3.3. Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Although lungs have long been regarded as sterile, bacterial colonization begins soon after birth and is a dynamic process influenced by environmental and genetic factors. Bacteria from the upper respiratory tract and the environment reach the lower respiratory tract through breathing, mucociliary clearance, and microaspiration [112]. In healthy subjects, there are important similarities between oral and lung microbiota [113,114], and a microbiome dominated by *Streptococcus, Prevotella, Veillonella*, *Pseudomonas, Haemophilus*, and *Fusobacterium* has been described in the respiratory tract [115]. While the mechanisms have yet to be understood, lung microbiota changes in chronic respiratory diseases are increasingly studied.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by dyspnea, chronic cough, and sputum, resulting from chronic inflammation within the respiratory airways [116]. Lung microbiota evolves according to disease severity [117] and exacerbations, characterized by alveolar rupture, increased mucus production, and disease aggravation, which are mainly caused by microorganisms promoting inflammatory mediators' production by inflammatory cells [118,119]. Studies showed that *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae (Sp), Pseudomonas aeruginosa (Pa*), and *Moraxella catarrhalis* are the main microorganisms involved in acute exacerbations of COPD (AECOPD) [118,120,121] and interestingly, a study showed the presence of *Sp* and *Pa* in subgingival plaque and *Pg* and *Td* in the tracheal aspirates of patients suffering from acute exacerbation of COPD [122]. Several clinical studies showed that periodontitis is associated with an increased risk of developing COPD, independently of conventional risk factors (tobacco, age) [123,124]. Moreover, periodontal treatment is accompanied by a reduction of exacerbations and respiratory parameters [125,126]. Recent studies showed that *Fn* is able to induce proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 production by respiratory epithelial cells in vitro and in vivo [127]. Moreover, *Fn* and *Pa*, which coexist in the respiratory system of patients suffering from AECOPD, can collaborate to sustain bacterial growth in a co-culture model [128]. Simultaneous coinfection of human respiratory epithelial cell lines with *Fn* and *Pa* promotes cell invasion and induces IL-6, IL-8, and TNF-α in vitro [129].

Besides COPD, a recent study showed that periodontitis seems to be associated with increased risk of intensive care unit admission, need for assisted ventilation, and death of patients suffering from SARS-CoV-2 [130]. In vitro experiments suggest that the aspiration of periodontopathogen bacteria like *Fn* by patients with COVID-19 may aggravate lower respiratory tract inflammation [131].

3.4. Rheumatoid Arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) is an auto-immune disease characterized by chronic inflammation of the joints. At the anatomopathological level, the synovial membrane, when inflamed, forms what is called a "pannus," which leads to the destruction of the joints. Its incidence is 0,5% to 1% and concerns mostly women between the ages of 40 and 60 [132]. In 50 to 70% of cases, patients produce autoantibodies against citrullinated peptides (ACPAs) and autoantibodies against IgG (RF, for rheumatoid factor) [133]. ACPAs are able to form immune complexes with citrulline-containing antigens that then link the RF, leading

to important complement activation [134]. This immune activation is responsible for synovial membrane inflammation along with leucocyte infiltration into the synovial compartment of the joints [133]. This inflammation induces fibroblast activation, enhanced chondrocyte catabolism, and synovial osteoclastogenesis, leading ultimately to articular destruction [135]. Interestingly, circulating ACPAs can be detected long before RA diagnosis [136–138].

For several years, the role of periodontitis and its microbiota has been studied in the development of rheumatoid diseases such as RA. Indeed, studies have shown that patients with RA are more likely to develop chronic periodontitis compared to healthy people [139]. Other studies have shown that patients with RA have a significantly higher prevalence of moderate to severe periodontitis (62.5%). In addition, patients with periodontal follow-up (therefore associated with periodontitis) have a higher prevalence of RA (4%) than the general population (1%) [132]. These two inflammatory pathologies develop under the influence of many common risk factors, whether genetic with the polymorphism of certain receptors, but also immune with increased production of interferon-gamma, B lymphocytes, and RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand) associated with activation of the inflammation system with a TH17 (lymphocyte T Helper cells expressing IL-17) profile [140]. The presence of bacteria in the synovia and an increased level of inflammatory mediators in the blood (CRP) were also common between these two pathologies [141]. Thus, there is a bidirectional link between periodontitis and RA: patients with periodontitis are more likely to suffer from RA, and conversely, patients with RA have a greater risk of periodontitis [138,142–144].

Chronic periodontitis is believed to be involved in the initiation and progression of RA mainly by two major biological pathways. First, the passage of bacteria and pro-inflammatory cytokine of periodontal origin in the bloodstream favoring the development of joint inflammation. In fact, many microorganisms are mentioned in these hypotheses, such as Mycoplasmas, viruses (Epstein Barr virus and Cytomegalovirus), and bacteria of the periodontal microbiota. The presence of bacterial DNA and peptidoglycans, constituents of their wall, in the joints of patients with RA has been demonstrated. Among periodontal bacteria, the most regularly detected are *Pi* and *Pg*, as well as *Bacteroides forsythus* [145]. The prescription in these patients of antibiotic treatments against oral anaerobic bacteria leads to an improvement in the clinical signs of RA.

Secondly, the link between periodontitis and RA has been studied through the specific role of *Pg* due to its enzymes, the peptidyl-arginine-deiminases (PAD), which could carry out the citrullination (post-translational modification) of certain peptides [146]. The result is the production of antibodies that recognize the host's citrullinated peptides, which is indicative of clinical signs of RA. *Pg* is able to citrullinated bacterial and human proteins, leading to the formation of APCAs, and potentially contributing to the initiation of RA [147,148]. The positive assay of these ACPAs makes it possible to predict, with a specificity greater than 95%, the early diagnosis of RA. Studies show that the level of anti-*Pg* antibodies is correlated with the level of ACPAs in patients with RA. The concentration of anti-*Pg* antibodies is increased in RA patients compared to healthy subjects and detectable several years before the appearance of RA symptoms [149]. More recently, a study showed that *Aa* is also able to release hyper-citrullinated proteins and that there is a strong association between the concentration of anti-*Aa* antibodies and the presence of ACPAs and RF in patients with RA [150].

While the effects of periodontal treatment are controversial, with conflicting results among studies, and well-conducted clinical trials are needed to conclude on this point [151–154] firmly, it seems that anti-inflammatory treatment for RA induces a reduction in gingival inflammation (IL-1β) [155]. Interestingly, an in vivo study on mice showed that ACPAs serum concentration is reflected in the saliva. A human study observed alteration of oral microbiota in the pre-clinical stages of RA, suggesting that oral status could be an early marker of RA development [151,156]. There is, therefore, an interrelation between

these two inflammatory pathologies with significant production of pro-inflammatory cytokines [152].

3.5. Adverse Pregnancy Outcomes

During pregnancy, physiological, immunological, and hormonal modifications occur in the mother, increasing her susceptibility to infections, including oral and periodontal diseases [153,154]. Also, changes in estrogen and progesterone levels affect the composition of the oral microbiota, which becomes compatible with the development of gingivitis and periodontitis [157,158]. Oral saliva of pregnant women that underwent 16S rRNA gene sequencing shows that the oral microbial diversity is relatively stable during pregnancy. However, compared to non-pregnant women, it makes a pathogenic shift during pregnancy associated with pregnancy gingivitis before reverting to a healthy microbiome during the post-partum period [159]. Also, oral dysbiosis, as described in periodontitis, can increase the risk of adverse pregnancy outcomes (APO), including preterm birth, preeclampsia, gestational diabetes, and low birthweight [160,161]. Furthermore, maternal periodontal conditions seem to be associated with stillbirth and perinatal death [162,163]. Three biological mechanisms supporting this relationship between periodontal diseases and APO have been proposed: one through systemic dissemination of periodontal pathogens that could cross the placenta into the amniotic fluid and fetal circulation, the other through inflammatory mediators such as IL-6, IL-8, and TNF-α produced during periodontal inflammation that could, by entering the systemic circulation, induce an acute inflammatory response affecting the fetus and placenta, and finally, the possibility of oral microbiological transmission to the vaginal microbiome resulting from sexual practice [9,164,165]. Also, the placenta harbors a unique microbiome structured by the history of antenatal infections and shares similarities with the oral microbiome [166]. Recent studies have shown that both placental and oral microbiomes may play a role in periodontitis-associated APO [167]. *Pg* and *Fn* Gram-negative anaerobes commonly found in periodontitis have been shown to be able to translocate to the fetal-placental unit [168,169] and are associated with APO such as preeclampsia, early-onset neonatal sepsis, and stillbirth [167,170].

Finally, concerning the transmission of the maternal microbiome to the child, recent research on families with adopted and biological children shows that the composition of the microbiome seems to be shaped more by the host and contact with the local environment than by genetics and direct transfer of this microbiome through pregnancy outcomes and especially delivery modes (C-section or vaginal delivery) [4]. Babies fed only on breast milk have a lower diversity with a decreased relative abundance of *Veillonella, Prevotella, Granulicatella,* and *Porphyromonas* than those fed only on formula, but these differences do not persist over time. Also, at two months, the salivary microbiome of infants delivered by C-section is significantly more diverse than those delivered vaginally, but again these differences seem to disappear at 12 months [171]. The salivary microbiome is dynamic during the first two years of life, and age-related factors seem to be the strongest determinants. Colonization by species such as *Candida albicans* is a good example of these age-related changes in exposure [171].

3.6. Inflammatory Bowel Diseases

Chronic inflammatory bowel diseases (IBD) mainly include Crohn's disease and ulcerative colitis. These pathologies are characterized by chronic intestinal inflammation evolving into a variable course of flare-ups and remissions. Although the etiology is still imperfectly known today, the main hypothesis is an inadequate intestinal immune response to bacteria in the commensal flora, probably triggered by environmental factors associated with genetic predispositions. Extra-digestive manifestations at the musculoarticular, cutaneous, oral, and ophthalmological levels are the most frequent and often progress in parallel to digestive disease outbreaks [172,173]. The oral cavity is a preferential site for extra-digestive manifestations: 50% of IBD patients develop oral lesions with

a wide variety of clinical forms [174]. They may be specific to intestinal pathology (inaugural, at the same time, or after the appearance of gastrointestinal symptoms), or they may be reactive, i.e., the consequence of drug treatments and nutritional deficiencies due to malabsorption and malnutrition (so-called non-specific lesions) [175,176]. They may also be an early sign of therapeutic escape or disease relapse. People suffering from IBD are characterized by dysbiotic oral and gut microbiota with a decrease in bacterial diversity, a decrease in the abundance of Firmicutes phylum, and an increase in the abundance of Proteobacteria and Bacteroidetes phylum [102,177–179]. Recent studies showed that, compared to healthy people, these people also presented an oral dysbiosis and that periodontitis was significantly associated with IBD [180,181]. However, the exact nature of oral dysbiosis remains unclear and differs between studies. Some authors observed an increase in *Eikenella corrodens*, *Prevotella* genus, *Veillonella* genus, and a decrease in *Streptococcus* genus, *Haemophilus* genus, *Neisseria, and Gemella* families in IBD patients compared to healthy subjects [182,183]. However, others observed an increase in *Campylobacter* genus, Streptoccocaceace, Enterobacteriaceae, and Veillonellaceae families and a decrease in Porphyromonadaceae and Neisseriaceae families [184–186]. Furthermore, the oral microbiota of Crohn's disease patients was associated with a decrease in *Neisseria, Haemophilus, Fusobacterium,* and *Porphyromonas* genera compared to patients in remission [187]. In addition, an increase in the number of oral bacteria in the gut microbiota has been observed in IBD patients: *Aggregatibacter, Campylobacter, Enterobacteria, Fusobacterium, Gemella, Neisseria, Veillonella, Peptostreptococcus, and Streptococcus* [188–190]. Therefore, it can be assumed that the oral microbiota, capable of colonizing the gastrointestinal tract, may act as a pathogen reservoir and thus play a role in the pathogenesis and aggravation of IBD [188,191]. There are two possible mechanisms for the translocation of oral bacteria into the gut: the haematogenous route and the enteral route. Oral dysbiosis (characterized by an increase in Gram-negative bacteria) can lead to translocation of these bacteria and their virulence factors into the bloodstream. This leads to an increased immune and inflammatory response at the systemic level[9]. The function of the intestinal barrier may also be impaired. Studies in mice have shown that oral administration of *Pg* increased intestinal barrier permeability through down-regulation of tight junction proteins, resulting in significant alteration of the gut microbiome. In addition, mice inoculated with *Pg* exhibited intestinal and systemic inflammation caused by *Pg*-derived endotoxins, such as LPS [192,193]. Another possible route of dissemination of oral bacteria is enteral dissemination. IBD patients have chronic intestinal inflammation with an altered intestinal barrier that leads to increased colonization of oral bacteria at the intestinal level [188,189]. The impact of these oral pathogens in the gut can lead to worsening of chronic gut inflammation. Inoculation of the oral microbiome of IBD children into germ-free mice resulted in enrichment of *Fusobacterium*, *Veillonella* and *Klebsiella spp* in the gut. Ectopic colonization of these bacteria and in particular *Klebsiella spp* caused potent T helper 1 (TH1) cell differentiation and inflammation in the gut [194]. Mechanisms of ectopic colonization of the gut by oral bacteria and their role in pathogenesis of IBD still need to be clarified. A better understanding of the oral microbiota in IBD could initiate the development of new diagnostic and therapeutic tools and strategies to target oral bacteria in the management of IBD.

3.7. Alzheimer's Disease

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease. It causes progressive and irreversible loss of memory (amnesia), executive function, language (agnosia), and Spatiotemporal orientation disorders leading to dementia and death. It is the most common cause of dementia, with a prevalence of approximately 60–80% worldwide [195,196]. AD is characterized, on the one hand, by the formation of amyloid plaque (also called senile plaque) caused by an extracellular accumulation of the nerve cell-toxic beta-amyloid peptide. On the other hand, neurofibrillary degeneration is related to the accumulation of phosphorylated tubulin-associated unit (TAU) proteins [197]. Inflammation plays an im-

portant role in the development and progression of AD. Indeed, there is a close link between beta-amyloid proteins, oxidative stress, and neuroinflammation in the brain, which leads to the loss of neurons and disease progression [198]. The most commonly cited risk factors are genetic and environmental [199]. In recent years, numerous studies have suggested the involvement of oral microbiota in AD [200–202]. Patients with AD present a dysbiotic oral microbiota with a decrease of bacterial diversity and an increase of prevalence of the *Moraxella, Leptotrichia,* and *Sphaerochaeta* genera [203]. Moreover, serum antibodies to seven oral bacteria (*Aa, Campylobacter rectus, Fn, Pg, Pi, Tf,* and *Td*) have been found at a higher level in patients with AD, compared with controls [204]. Correlation between the presence or absence of periodontitis and AD has been reported [205,206]. Tooth loss is positively associated with an increased risk of dementia in adults [207]. Two mechanisms may contribute to the progression of AD via the dysbiotic oral microbiota. First, the interaction between oral bacteria or meta factors (*e.g.*, LPS) and the host response leads to a significant production of inflammatory molecules at the systemic level via the TLR-4/NF-κB signaling pathway [208,209]. Systemic inflammation and pro-inflammatory mediators such as CRP, TNF-α, IL-6, and IL-1, are able to activate microglia, which induce increased production of pro-inflammatory molecules and exacerbate neuroinflammation leading to neurodegeneration [210]. The other mechanism by which oral bacteria may contribute to brain inflammation is through bacterial translocation. Not only pro-inflammatory cytokines but also Gram-negative oral bacteria and their virulence factors (LPS) can enter the brain via the blood-brain barrier. LPS from *Pg* and *Td* have been found in post-mortem human brains with AD [211]. Studies on mice have shown the presence of *Pg* in the brain after oral injection. Exposure to *Pg* induced Alzheimer's disease-like phenotypes in mice with neurodegeneration, amyloid accumulation, impaired cognitive function and reduced learning and memory [210–213]. Finally, a person with dementia or AD has difficulty maintaining good oral hygiene or regular follow-ups with the dentist, which increases the risk of poor oral health and oral dysbiosis. Also, a recent study exploring the relationships between AD and periodontal treatment, showed that periodontal treatment had a favorable effect on AD-related brain atrophy explored by magnetic resonance imaging [214].

3.8. Autism Spectrum Disorders

Autism spectrum disorders (ASD) are complex neurodevelopmental disorders that manifest themselves in the first two years of life. They are characterized by persistent deficits in attention, language, and social interaction, often accompanied by restricted interests and repetitive behavior [215]. The prevalence of ASD has been steadily increasing over the past decades. Currently, 1% of the general population is affected by ASD [216]. The causes of autism are still poorly defined. The involvement of several risk factors has been highlighted: genetic, environmental, neuro-pathological, inflammatory, and immunological. Also, maternal prenatal infection and high levels of pro-inflammatory cytokines increase the risk of ASD in children. Concerning microbiota, studies have focused mainly on the relationship between dysbiosis of the intestinal microbiota and ASD, highlighting the microbiota-gut-brain axis in the animal model. However, an increasing number of studies are looking into the role played by the oral cavity and its microbiota. Children with ASD do not have specific oral characteristics related to their pathology, but limited communication, self-neglect, self-mutilation, and eating habit (soft and sweet food) disorders have consequences on their oral health. They have poorer oral hygiene, a higher prevalence of caries, bruxism, and erosions due to frequent regurgitations [217–219]. Pain hypersensitivity and communication difficulties lead to delayed oral health care. A recent study showed a difference in the composition of the oral microbiota in ASD patients compared to controls. Patients with ASD showed a decrease in bacterial diversity, an increase in the proportion of pathogenic bacteria such as *Haemophilus* and *Streptococcus,* and a decrease in the proportion of commensal bacteria such as *Alloprevotella, Prevotella, Selenomonas, Actinomyces, Porphyromonas,* and *Fusobacterium* [220]. Furthermore, a similar change

in the gut microbiota in children with ASD has also been observed, suggesting a potential interaction of the oral microbiota on the gut microbiota [220–222]. To date, the direct relationship between ASD and oral microbiota has not been clearly established. However, saliva can be used as a biomarker to help diagnose ASD and allow early management. Recently, the measurement of salivary poly-omic RNA has been described as a new approach to identify children with ASD [223] accurately. Finally, dysbiosis of the microbiota may modulate social behavior, and conversely, restoration of a healthier microbiota may improve ASD symptoms [224,225]. Wang et al. reported that oral probiotics could reduce ASD-like behaviors in offspring induced by maternal immune activation[226].

3.9. Oral Mucosal Disease

Oral mucosal disease (OMD) is a series of disorders or conditions affecting the oral soft tissues and mucosa. OMD mainly includes oral infectious diseases such as oral candidiasis, oral lichen planus (OLP) or oral mucosal patches striae diseases, ulcerative lesions such as recurrent aphthous ulcers (RAU), oral premalignant lesions like oral leukoplakia (OLK), and oral cancers, mainly oral squamous cell carcinoma (OSCC) [227]. OMDs share multiple risk factors, including genetic predisposition, immunological disturbances, viral and bacterial infections, food allergies, and nutritional deficiencies, and also hormonal imbalance, mechanical repetitive injuries, and stress. Even though their etiopathogenesis is not yet fully understood, it is well admitted that these different risk factors have the ability to disrupt the diversity and composition of the commensal oral microbiota leading to oral dysbiosis [228].

3.9.1. Oral Microbiota and oral lichen planus

Oral lichen planus (OLP) is a common chronic T-cell-mediated inflammatory oral mucosal disease that occurs in approximately 0.5–2% of the general adult population, with a higher prevalence in women than in men [229]. OLP affects the buccal mucosa, but also the gingiva, tongue, and lips, and in some cases, skin, nails, eyes, and urogenital mucosa. There are essentially two forms of OLP lesions: reticular or non-erosive and erosive. The erosive and non-erosive but atrophic forms of OLP may cause soreness and discomfort and have also been reported as being at risk of malignant transformation in 1–2% of cases [223]. Recent studies on the composition of the oral microbiome focusing particularly on the mycobiome in salivary samples showed that OLP patients (both erosive and reticular forms) had, overall, lower biodiversity of their oral fungal community but an increase in the abundance and frequencies of the genera *Candida* and *Aspergillus* [230]. Interestingly, however, the patients' bacteriome was significantly more diverse than that of healthy subjects. Also, *Candida* was positively correlated with several anaerobic, periodontopathogen bacterial genera such as *Treponema, Bacteroides, Aggregatibacter, Captnocytophaga,* and *Veillonella* [230]. *Candida,* by its high level of O_2 consumption permitting the formation of an anaerobic micro niche for these strictly anaerobic bacterial species.

3.9.2. Oral microbiota and recurrent aphthous ulcers

Recurrent aphthous ulcers (RAU) or recurrent aphthous stomatitis (RAS), characterized by shallow round painful ulcers, are the most common form of oral ulcerative diseases that affect as much as 5–20% of the population [231]. Using new tools to investigate the oral microbiome, such as throughput sequencing and pyrosequencing, has led to the identification of potential bacterial candidates responsible for RAU. The increase in *E. Coli* and *Alloprevotella* associated with a decrease of *Streptococcus* seems to be responsible for RAU [232]. When comparing the oral microbiota of healthy and RAU subjects, the salivary microbiota of RAU subjects tended to contain decreased Firmicutes and increased Proteobacteria. Also, a decrease in *Streptococcus salivarius* and an increase in *Acinetobacter johnsonii* seem to be associated with RAU risk [233]. Finally, when comparing erosive OLP and

RAU lesions, studies found that their microbiome was significantly different. The microbiome changes may thus be more related to the diseases themselves rather than to the oral lesions observed clinically. For example, *Streptococcus* and *Sphingomonas* were two of the most abundant bacterial species found in the saliva of OLP patients but were also two of the less abundant species found in the saliva of RAU patients [234]. Taken together, these findings could lead to the development of future diagnostic tools and offer new insight on host immunologic responses and possible cause-effect relationships of these disorders.

3.9.3. Oral microbiota and oral leukoplakia (OLK) and oral squamous cell carcinoma (OSCC)

Oral leukoplakia (OLK) is defined as a predominantly white lesion of the oral mucosa that cannot be wiped off the mucosa or ascribed to any specific disease process. OLK is often considered a premalignant OMD [228]. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) represents the most common cancer of the oral cavity and comprises 80-90% of head and neck cancers with a 50% survival rate at 5 years [235]. The role of specific microbiotas on the development of cancers can be explained through different mechanisms, especially the production of toxins, loss of hormonal homeostasis, and immune tolerance, but also induction of chronic inflammatory signals and carcinogenic metabolites [236]. Several studies on the oral microbiome have been carried out to identify potential microbiota changes and bacteria candidates specific to OLK and OSCC [237,238]. Also, there seems to be a shift in the oral microbiome profile associated with disease progression from OLK to OSCC and during cancer progression from stage 1 to stage 4 [238,239]. Such as in OLP, colonization with *Candida albicans* is common. Studies have shown that, even though bacteria colonization patterns are highly variable, increased abundance of Fusobacteria and reduced levels of Firmicutes are found in OLK [240]. When comparing the salivary microbiome of OLK patients to OSCC subjects, researchers have shown that OSCC subjects have a higher abundance of the phylum Bacteroidetes and *Solobacterium* genus compared to the OLK group, whereas the Streptococcus genus was significantly lower in the OSCC group compared to OLK [241]. This microbiome shift could be a novel precursor marker of malignant transformation of a precancerous lesion [227]. Despite recent data and research progress in the field liking microbiome changes and OMDs, several challenges remain in order to confirm this correlation. Also, confirmation will be essential in order to the make the oral microbiome the target of future diagnostic tools and preventive treatments for OMDs modulation therapies.

4. Oral Cavity as a Reflection, Target, and Actor of Our General Health

As summarized in Figure 2, the literature shows increased evidence on the links between the oral cavity, its dysbiotic microbiota, and systemic diseases [8,157,242]. Oral diseases are now considered to be the consequence of a deleterious change in the balance of the oral microbiota making oral microbiota identification and management a major research axis of great interest for practitioners (Figure 3).

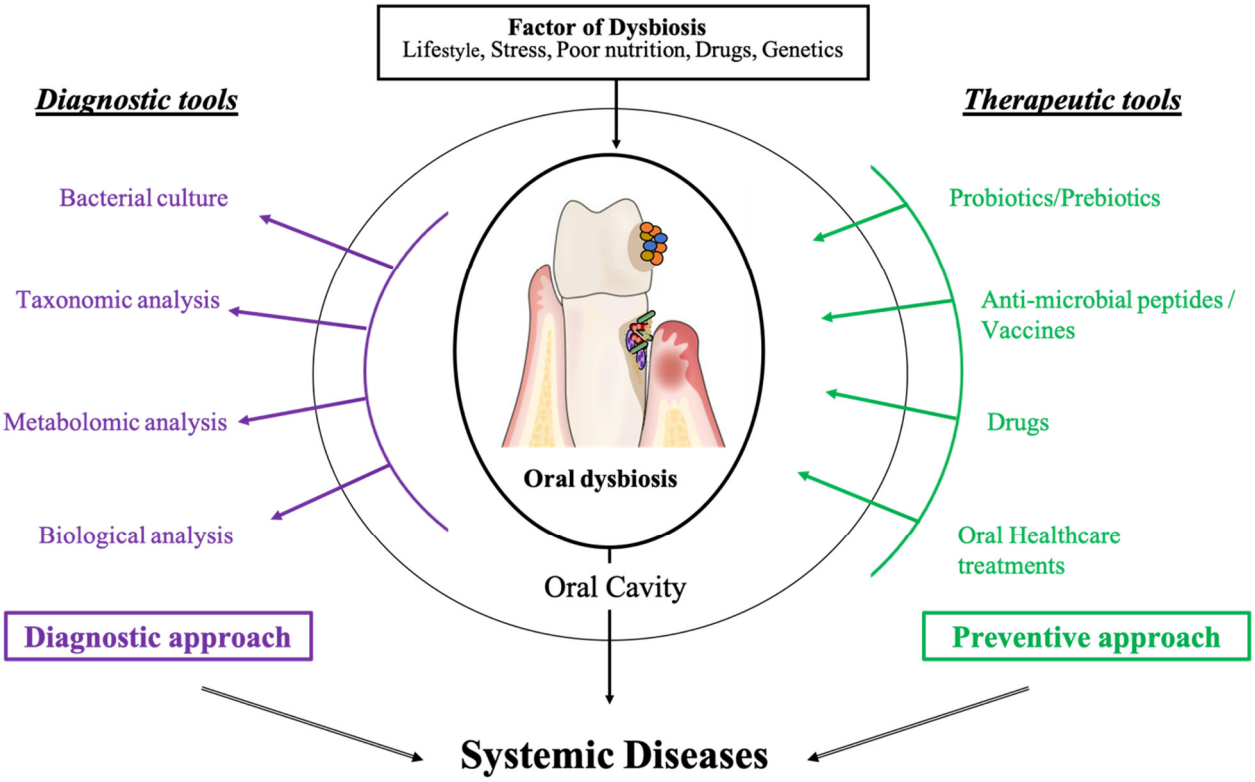


Figure 3. The oral microbiota is a biomarker, diagnostic tool, and target for systemic disease diagnosis and treatment.

4.1. Saliva as a Diagnostic Tool

Because it is easily accessible in a non-invasive and inexpensive way, saliva is becoming the new fluid of major interest in the detection of systemic parameters [243]. Salivary biomarkers allow the implementation of novel strategies to help diagnose, limit the prevalence of systemic diseases, and offer new therapeutic tools. The best example came in the past 18 months, with the SARS-CoV-2 infection. Not only is the oral cavity the siege site of the viruses side effects (infection, loss of taste, mucosal damage) and a probably underestimated site for SARS-CoV-2 infection [244], it also offers, with saliva analysis, a quick, reliable, and simple method for collecting samples compared to the nasopharyngeal test [245]. Several kits are already commercialized and used chair side to detect caries (CRT bacteria®), periodontal diseases, or IL-6 polymorphism (MyPerioPath®, My PerioID®) or to determine the risk of developing OSCC (OraRisk® HPV test) [246]. Furthermore, in the field of cancer, the development of techniques such as liquid biopsies and saliva liquid biopsies are being investigated with promising results, especially in lung cancer [247–249]. Because saliva is easier to collect, store, and analyze, research in salivaomics will have an important impact in the future to diagnose systemic diseases and potentially monitor disease relapse or aggravation [249,250].

Further technological innovation could reside in the creation of biosensors incorporated in the teeth and measuring the levels of oral biomarkers or quantify enzymes or bacteria present in the oral cavity. These biosensors may be the next approach to monitor an individual's metabolic status continuously. Mannoor et al. proposed a first version of a "connected tooth" [251]. These authors reported the "grafting" onto a tooth of a graphene "nano sensor" of antimicrobial peptides (antimicrobial peptides or AMP) existing in nature to detect certain species such as *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, or *Staphylococcus aureus*. They showed that it was possible to detect the binding of a single bacterium on a sensor, confirming the idea that biosensors incorporated in the teeth could possibly be used to monitor disease status constantly. This would support David Wong's proposition

that "oral fluid (saliva), the mirror of the body, is a perfect medium to explore for health and disease surveillance" [252].

4.2. Novel Therapeutic Strategies

At the dawn of new, less invasive medicine, one wonders about the benefit of broad-spectrum eradication of oral bacteria and the increase in microbial resistance due to multiple antiseptic and antibiotic treatments [253–256]. The problem for healthcare practitioners is to offer innovative therapies to resolve the prevalence and co-morbidity of oral and systemic diseases. The search for and development of new therapeutic approaches should, however, not undermine the use of existing therapies such as oral health education, restorative dentistry, and non-surgical periodontal therapies in controlling oral dysbiosis and restoring a healthy environment [257,258].

Unfortunately, such "classic" treatments are often insufficient in maintaining oral eubiosis [259]. Thus, new preventive strategies using pre/probiotics are emerging [260]. Numerous studies on the oral microbiota allowed scientists and mathematicians to generate a large database that can lead to the identification of new probiotics from oral microbiota in metabolic regulation. Already, specific probiotics such as *Bifidobacterium pseudocatenulatum* and *Bifidobacterium catenulatum* are used to treat liver damage by attenuating D-galactosamine [261]. Also, in mice, treatment with the probiotic *Bifidobacterium pseudocatenulatum* reduces obesity and inflammation by improving the epithelial barrier of the oral cavity [262,263]. In the oral cavity, guided periodontal pocket recolonization associated with periodontal non-surgical treatment reduced local inflammation and improved long-term clinical outcomes [264]. For example, nitrate used as a prebiotic or a symbiotic with nitrate-reducing probiotics could be promising in preventing oral disease and improving systemic conditions such as hypertension and diabetes, as shown in an in vitro study [265].

Another approach relies on host modulation therapy in order to control and reduce local inflammation, thus reducing systemic inflammation [266,267]. AMPs can affect the homeostasis of the oral cavity through the broad or selective killing of bacteria, but also, due to their immunomodulatory properties, they can influence both the innate and adaptive immune response [268,269]. The most studied AMPs are Leucine leucine-37 (LL-37), α-, and β-defensins. A recent systematic review on the subject reveals that, in saliva, some AMPs such as LL-37, HNP1-3 (Human Neutrophil Peptide 1–3), substance P, adrenomedullin, azurocidin, and some others were increased in periodontal disease, while others like calcitonin gene-related protein or neuropeptide Y were decreased [270]. They could thus be used either as novel disease markers or designed to target specific oral bacteria. Next to AMPs, other fields are investigated, and recently, an oxygen transporter derived from the marine lugworm *Arenicola marina*, HEMARINA-M101 (M101), was tested. M101's anti-inflammatory and anti-infectious potential, based on its anti-oxidative and tissue oxidation properties, have been tested in vitro on biofilm cultures containing *Pg* and in vivo in a *Pg*-induced subcutaneous calvarial abscess in a mouse model [271]. The results showed that M101 significantly reduced the release of pro-inflammatory cytokines and also had an anti-bacterial effect on *Pg,* confirming its pro-healing properties and making it a potential therapeutic agent in periodontal wound healing and regeneration [271].

Also, oral and chronic systemic diseases share nutrition as a risk factor. Even if the role of micronutrients and vitamins remains to date still unclear, any change in oral health should be considered as a warning sign in the prevention of the development of systemic diseases [272]. For example, in in-vivo animal models, Resolvin E1, an endogenous anti-inflammatory lipid mediator derived from Omega-3 eicosapentaenoic acid, seems to suppress bone loss and restore systemic levels of IL-1β and CRP, also attenuating the inflammatory signal leading to periodontal destruction with no unwanted side-effects [273,274]. Another example is the level of vitamin D and its role in periodontal disease and metabolic disorders [275–278]. The relationship between vitamin D deficiency and insulin resistance could be explained by inflammation, as vitamin D deficiency is associated with increased

inflammatory markers, initial insulin resistance, and subsequent onset of diabetes caused by the death of β cells. In fact, we now know that chronic periodontitis [279] is associated with a low level of vitamin D and, more precisely, with a low serum level of 1,25 (OH) 2D. This type of link corresponds to the associations previously reported between vitamin D and other inflammatory diseases [280,281]. Epidemiological studies have shown an association between a low serum concentration of 25-hydroxyvitamin D3 (25 (OH) D3) and an increased risk of metabolic syndrome and Type 2 diabetes, which may be explained in part by an increase in blood pressure [278]. Importantly, genetic polymorphisms in genes linked to vitamin D can predispose to impaired glycemic control and T2D [282].

Finally, identifying new bacteria candidates using novel techniques such as next-generation sequencing and new delivery systems designed specifically for targeting oral bacteria (i.e., caries or periodontal disease-associated oral dysbiosis) could lead to the development of vaccines in the near future [283–285].

5. Conclusions

Oral microbiota is a complex organism acquired from birth, influenced by environmental, genetic, and behavioral factors. It interacts with the host's other microbiotas and is important in health and disease. Diagnosing, controlling, and treating oral dysbiosis can have an impact on systemic diseases and patients' oral and general wellbeing [286]. It also has an impact on society from a socio-economic point of view [287–289].

Data from the literature concerns many medical specialties such as cardiology, angiology, dermatology, and endocrinology, and even if future studies are needed in order to fully understand the link and assess the impact of oral health on general health and vice versa, oral specialists should be aware of its existence and work together with other medical specialists to better serve their patients' needs and improve their quality of life.

Author Contributions: C.T., M.M., A.V., V.B-B., S.L.-D.: writing—review and editing. C.T., M.M., A.V., T.C., P.L., R.B., M.K., V.B-B., S.L.-D.: critically revised manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hug, L.A.; Baker, B.J.; Anantharaman, K.; Brown, C.T.; Probst, A.J.; Castelle, C.J.; Butterfield, C.N.; Hernsdorf, A.W.; Amano, Y.; Ise, K.; et al. A New View of the Tree of Life. *Nat Microbiol* **2016**, *1*, 16048, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.48.
2. Baker, J.L.; Bor, B.; Agnello, M.; Shi, W.; He, X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 362–374, doi:10.1016/j.tim.2016.12.012.
3. Zhang, Y.; Wang, X.; Li, H.; Ni, C.; Du, Z.; Yan, F. Human Oral Microbiota and Its Modulation for Oral Health. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *99*, 883–893, doi:10.1016/j.biopha.2018.01.146.
4. Mukherjee, C.; Moyer, C.O.; Steinkamp, H.M.; Hashmi, S.B.; Beall, C.J.; Guo, X.; Ni, A.; Leys, E.J.; Griffen, A.L. Acquisition of Oral Microbiota Is Driven by Environment, Not Host Genetics. *Microbiome* **2021**, *9*, 54, doi:10.1186/s40168-020-00986-8.
5. Gomez, A.; Nelson, K.E. The Oral Microbiome of Children: Development, Disease, and Implications Beyond Oral Health. *Microb. Ecol.* **2017**, *73*, 492–503, doi:10.1007/s00248-016-0854-1.
6. Weyrich, L.S. The Evolutionary History of the Human Oral Microbiota and Its Implications for Modern Health. *Periodontol. 2000* **2021**, *85*, 90–100, doi:10.1111/prd.12353.
7. Lamont, R.J.; Koo, H.; Hajishengallis, G. The Oral Microbiota: Dynamic Communities and Host Interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 745–759, doi:10.1038/s41579-018-0089-x.
8. Graves, D.T.; Corrêa, J.D.; Silva, T.A. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *J. Dent. Res.* **2019**, *98*, 148–156, doi:10.1177/0022034518805739.
9. Hajishengallis, G. Periodontitis: From Microbial Immune Subversion to Systemic Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 30–44, doi:10.1038/nri3785.

10. Gao, L.; Xu, T.; Huang, G.; Jiang, S.; Gu, Y.; Chen, F. Oral Microbiomes: More and More Importance in Oral Cavity and Whole Body. *Protein Cell* **2018**, *9*, 488–500, doi:10.1007/s13238-018-0548-1.
11. Verma, D.; Garg, P.K.; Dubey, A.K. Insights into the Human Oral Microbiome. *Arch Microbiol* **2018**, *200*, 525–540, doi:10.1007/s00203-018-1505-3.
12. Tuominen, H.; Collado, M.C.; Rautava, J.; Syrjänen, S.; Rautava, S. Composition and Maternal Origin of the Neonatal Oral Cavity Microbiota. *J Oral Microbiol* **2019**, *11*, 1663084, doi:10.1080/20002297.2019.1663084.
13. Kaan, A.M.M.; Kahharova, D.; Zaura, E. Acquisition and Establishment of the Oral Microbiota. *Periodontol 2000* **2021**, *86*, 123–141, doi:10.1111/prd.12366.
14. Dewhirst, F.E.; Chen, T.; Izard, J.; Paster, B.J.; Tanner, A.C.R.; Yu, W.-H.; Lakshmanan, A.; Wade, W.G. The Human Oral Microbiome. *J Bacteriol* **2010**, *192*, 5002–5017, doi:10.1128/JB.00542-10.
15. Aas, J.A.; Paster, B.J.; Stokes, L.N.; Olsen, I.; Dewhirst, F.E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol* **2005**, *43*, 5721–5732, doi:10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
16. Xu, X.; He, J.; Xue, J.; Wang, Y.; Li, K.; Zhang, K.; Guo, Q.; Liu, X.; Zhou, Y.; Cheng, L.; et al. Oral Cavity Contains Distinct Niches with Dynamic Microbial Communities. *Environ Microbiol* **2015**, *17*, 699–710, doi:10.1111/1462-2920.12502.
17. Marsh, P.D.; Do, T.; Beighton, D.; Devine, D.A. Influence of Saliva on the Oral Microbiota. *Periodontol 2000* **2016**, *70*, 80–92, doi:10.1111/prd.12098.
18. Lynge Pedersen, A.M.; Belstrøm, D. The Role of Natural Salivary Defences in Maintaining a Healthy Oral Microbiota. *J Dent* **2019**, *80 Suppl 1*, S3–S12, doi:10.1016/j.jdent.2018.08.010.
19. Hojo, K.; Nagaoka, S.; Ohshima, T.; Maeda, N. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J Dent Res* **2009**, *88*, 982–990, doi:10.1177/0022034509346811.
20. Li, J.; Helmerhorst, E.J.; Leone, C.W.; Troxler, R.F.; Yaskell, T.; Haffajee, A.D.; Socransky, S.S.; Oppenheim, F.G. Identification of Early Microbial Colonizers in Human Dental Biofilm. *J Appl Microbiol* **2004**, *97*, 1311–1318, doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02420.x.
21. Marsh, P.D.; Zaura, E. Dental Biofilm: Ecological Interactions in Health and Disease. *J Clin Periodontol* **2017**, *44 Suppl 18*, S12–S22, doi:10.1111/jcpe.12679.
22. Takahashi, N.; Nyvad, B. The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. *J Dent Res* **2011**, *90*, 294–303, doi:10.1177/0022034510379602.
23. Hajishengallis, E.; Parsaei, Y.; Klein, M.I.; Koo, H. Advances in the Microbial Etiology and Pathogenesis of Early Childhood Caries. *Mol Oral Microbiol* **2017**, *32*, 24–34, doi:10.1111/omi.12152.
24. Mira, A.; Simon-Soro, A.; Curtis, M.A. Role of Microbial Communities in the Pathogenesis of Periodontal Diseases and Caries. *J Clin Periodontol* **2017**, *44 Suppl 18*, S23–S38, doi:10.1111/jcpe.12671.
25. Tanner, A.C.R.; Kressirer, C.A.; Rothmiller, S.; Johansson, I.; Chalmers, N.I. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Adv Dent Res* **2018**, *29*, 78–85, doi:10.1177/0022034517736496.
26. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C.; Kent, R.L. Microbial Complexes in Subgingival Plaque. *J Clin Periodontol* **1998**, *25*, 134–144, doi:10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x.
27. Armitage, G.C.; Dickinson, W.R.; Jenderseck, R.S.; Levine, S.M.; Chambers, D.W. Relationship between the Percentage of Subgingival Spirochetes and the Severity of Periodontal Disease. *J Periodontol* **1982**, *53*, 550–556, doi:10.1902/jop.1982.53.9.550.
28. Curtis, M.A.; Diaz, P.I.; Van Dyke, T.E. The Role of the Microbiota in Periodontal Disease. *Periodontol 2000* **2020**, *83*, 14–25, doi:10.1111/prd.12296.
29. Diaz, P.I.; Hoare, A.; Hong, B.-Y. Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *J Calif Dent Assoc* **2016**, *44*, 421–435.
30. Abusleme, L.; Dupuy, A.K.; Dutzan, N.; Silva, N.; Burleson, J.A.; Strausbaugh, L.D.; Gamonal, J.; Diaz, P.I. The Subgingival Microbiome in Health and Periodontitis and Its Relationship with Community Biomass and Inflammation. *ISME J* **2013**, *7*, 1016–1025, doi:10.1038/ismej.2012.174.
31. Scannapieco, F.A.; Dongari-Bagtzoglou, A. Dysbiosis Revisited. Understanding the Role of the Oral Microbiome in the Pathogenesis of Gingivitis and Periodontitis: A Critical Assessment. *J Periodontol* **2021**, JPER.21-0120, doi:10.1002/JPER.21-0120.
32. Loh, G.; Blaut, M. Role of Commensal Gut Bacteria in Inflammatory Bowel Diseases. *Gut Microbes* **2012**, *3*, 544–555, doi:10.4161/gmic.22156.
33. Gross, E.L.; Beall, C.J.; Kutsch, S.R.; Firestone, N.D.; Leys, E.J.; Griffen, A.L. Beyond Streptococcus Mutans: Dental Caries Onset Linked to Multiple Species by 16S RRNA Community Analysis. *PLoS One* **2012**, *7*, e47722, doi:10.1371/journal.pone.0047722.
34. Abusleme, L.; Hoare, A.; Hong, B.; Diaz, P.I. Microbial Signatures of Health, Gingivitis, and Periodontitis. *Periodontol 2000* **2021**, *86*, 57–78, doi:10.1111/prd.12362.
35. Hettne, K.M.; Weeber, M.; Laine, M.L.; Cate, H. ten; Boyer, S.; Kors, J.A.; Loos, B.G. Automatic Mining of the Literature to Generate New Hypotheses for the Possible Link between Periodontitis and Atherosclerosis: Lipopolysaccharide as a Case Study. *J Clin Periodontol* **2007**, *34*, 1016–1024, doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01152.x.
36. Zelkha, S.A.; Freilich, R.W.; Amar, S. Periodontal Innate Immune Mechanisms Relevant to Atherosclerosis and Obesity. *Periodontol. 2000* **2010**, *54*, 207–221, doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00358.x.
37. Lamster, I.B.; Pagan, M. Periodontal Disease and the Metabolic Syndrome. *Int Dent J* **2017**, *67*, 67–77, doi:10.1111/idj.12264.

38. Nibali, L.; Tatarakis, N.; Needleman, I.; Tu, Y.-K.; D'Aiuto, F.; Rizzo, M.; Donos, N. Clinical Review: Association between Metabolic Syndrome and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **2013**, *98*, 913–920, doi:10.1210/jc.2012-3552.
39. Morita, T.; Yamazaki, Y.; Mita, A.; Takada, K.; Seto, M.; Nishinoue, N.; Sasaki, Y.; Motohashi, M.; Maeno, M. A Cohort Study on the Association between Periodontal Disease and the Development of Metabolic Syndrome. *J Periodontol* **2010**, *81*, 512–519, doi:10.1902/jop.2010.090594.
40. Fan, Y.; Pedersen, O. Gut Microbiota in Human Metabolic Health and Disease. *Nat Rev Microbiol* **2021**, *19*, 55–71, doi:10.1038/s41579-020-0433-9.
41. Pascale, A.; Marchesi, N.; Marelli, C.; Coppola, A.; Luzi, L.; Govoni, S.; Giustina, A.; Gazzaruso, C. Microbiota and Metabolic Diseases. *Endocrine* **2018**, *61*, 357–371, doi:10.1007/s12020-018-1605-5.
42. Nitta, H.; Katagiri, S.; Nagasawa, T.; Izumi, Y.; Ishikawa, I.; Izumiyama, H.; Uchimura, I.; Kanazawa, M.; Chiba, H.; Matsuo, A.; et al. The Number of Microvascular Complications Is Associated with an Increased Risk for Severity of Periodontitis in Type 2 Diabetes Patients: Results of a Multicenter Hospital-Based Cross-Sectional Study. *J Diabetes Investig* **2017**, *8*, 677–686, doi:10.1111/jdi.12633.
43. Arneth, B.; Arneth, R.; Shams, M. Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, E2467, doi:10.3390/ijms20102467.
44. Graves, D.T.; Ding, Z.; Yang, Y. The Impact of Diabetes on Periodontal Diseases. *Periodontol 2000* **2020**, *82*, 214–224, doi:10.1111/prd.12318.
45. Kolb, H.; Martin, S. Environmental/Lifestyle Factors in the Pathogenesis and Prevention of Type 2 Diabetes. *BMC Med* **2017**, *15*, 131, doi:10.1186/s12916-017-0901-x.
46. Sharma, S.; Tripathi, P. Gut Microbiome and Type 2 Diabetes: Where We Are and Where to Go? *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2019**, *63*, 101–108, doi:10.1016/j.jnutbio.2018.10.003.
47. Matsha, T.E.; Prince, Y.; Davids, S.; Chikte, U.; Erasmus, R.T.; Kengne, A.P.; Davison, G.M. Oral Microbiome Signatures in Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *J Dent Res* **2020**, *99*, 658–665, doi:10.1177/0022034520913818.
48. Borrell, L.N.; Burt, B.A.; Taylor, G.W. Prevalence and Trends in Periodontitis in the USA: From the NHANES III to the NHANES, 1988 to 2000. *J Dent Res* **2005**, *84*, 924–930, doi:10.1177/154405910508401010.
49. Löe, H. Periodontal Disease. The Sixth Complication of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **1993**, *16*, 329–334.
50. Hotamisligil, G.S. Inflammation and Metabolic Disorders. *Nature* **2006**, *444*, 860–867, doi:10.1038/nature05485.
51. Xiao, E.; Mattos, M.; Vieira, G.H.A.; Chen, S.; Corrêa, J.D.; Wu, Y.; Albiero, M.L.; Bittinger, K.; Graves, D.T. Diabetes Enhances IL-17 Expression and Alters the Oral Microbiome to Increase Its Pathogenicity. *Cell Host Microbe* **2017**, *22*, 120-128.e4, doi:10.1016/j.chom.2017.06.014.
52. Casarin, R.C.V.; Barbagallo, A.; Meulman, T.; Santos, V.R.; Sallum, E.A.; Nociti, F.H.; Duarte, P.M.; Casati, M.Z.; Gonçalves, R.B. Subgingival Biodiversity in Subjects with Uncontrolled Type-2 Diabetes and Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **2013**, *48*, 30–36, doi:10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x.
53. Blasco-Baque, V.; Garidou, L.; Pomié, C.; Escoula, Q.; Loubieres, P.; Le Gall-David, S.; Lemaitre, M.; Nicolas, S.; Klopp, P.; Waget, A.; et al. Periodontitis Induced by Porphyromonas Gingivalis Drives Periodontal Microbiota Dysbiosis and Insulin Resistance via an Impaired Adaptive Immune Response. *Gut* **2017**, *66*, 872–885, doi:10.1136/gutjnl-2015-309897.
54. Amano, A. Disruption of Epithelial Barrier and Impairment of Cellular Function by Porphyromonas Gingivalis. *Front Biosci* **2007**, *12*, 3965, doi:10.2741/2363.
55. Cani, P.D.; Amar, J.; Iglesias, M.A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A.M.; Fava, F.; Tuohy, K.M.; Chabo, C.; et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **2007**, *56*, 1761–1772, doi:10.2337/db06-1491.
56. Mealey, B.L.; Oates, T.W.; American Academy of Periodontology Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *J Periodontol* **2006**, *77*, 1289–1303, doi:10.1902/jop.2006.050459.
57. Sharma, N.; Bhatia, S.; Sodhi, A.S.; Batra, N. Oral Microbiome and Health. *AIMS Microbiol* **2018**, *4*, 42–66, doi:10.3934/microbiol.2018.1.42.
58. Joshipura, K.J.; Muñoz-Torres, F.J.; Morou-Bermudez, E.; Patel, R.P. Over-the-Counter Mouthwash Use and Risk of Pre-Diabetes/Diabetes. *Nitric Oxide* **2017**, *71*, 14–20, doi:10.1016/j.niox.2017.09.004.
59. Turnbaugh, P.J.; Ridaura, V.K.; Faith, J.J.; Rey, F.E.; Knight, R.; Gordon, J.I. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci Transl Med* **2009**, *1*, 6ra14, doi:10.1126/scitranslmed.3000322.
60. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* **2006**, *444*, 1027–1031, doi:10.1038/nature05414.
61. Khor, B.; Snow, M.; Herrman, E.; Ray, N.; Mansukhani, K.; Patel, K.A.; Said-Al-Naief, N.; Maier, T.; Machida, C.A. Interconnections Between the Oral and Gut Microbiomes: Reversal of Microbial Dysbiosis and the Balance Between Systemic Health and Disease. *Microorganisms* **2021**, *9*, 496, doi:10.3390/microorganisms9030496.
62. MetaHIT consortium; Le Chatelier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J.-M.; et al. Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers. *Nature* **2013**, *500*, 541–546, doi:10.1038/nature12506.
63. Wu, Y.; Chi, X.; Zhang, Q.; Chen, F.; Deng, X. Characterization of the Salivary Microbiome in People with Obesity. *PeerJ* **2018**, *6*, e4458, doi:10.7717/peerj.4458.

64. Ley, R.E.; Turnbaugh, P.J.; Klein, S.; Gordon, J.I. Human Gut Microbes Associated with Obesity. *Nature* **2006**, *444*, 1022–1023, doi:10.1038/4441022a.
65. Haffajee, A.D.; Socransky, S.S. Relation of Body Mass Index, Periodontitis and *Tannerella Forsythia*. *Journal of Clinical Periodontology* **2009**, *36*, 89–99, doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01356.x.
66. Maciel, S.S.; Feres, M.; Gonçalves, T.E.D.; Zimmermann, G.S.; da Silva, H.D.P.; Figueiredo, L.C.; Duarte, P.M. Does Obesity Influence the Subgingival Microbiota Composition in Periodontal Health and Disease? *J Clin Periodontol* **2016**, *43*, 1003–1012, doi:10.1111/jcpe.12634.
67. Zeigler, C.C.; Persson, G.R.; Wondimu, B.; Marcus, C.; Sobko, T.; Modéer, T. Microbiota in the Oral Subgingival Biofilm Is Associated With Obesity in Adolescence. *Obesity* **2012**, *20*, 157–164, doi:10.1038/oby.2011.305.
68. Thomas, C.; Minty, M.; Canceill, T.; Loubières, P.; Azalbert, V.; Tercé, F.; Champion, C.; Burcelin, R.; Barthet, P.; Laurencin-Dalicieux, S.; et al. Obesity Drives an Oral Microbiota Signature of Female Patients with Periodontitis: A Pilot Study. *Diagnostics* **2021**, *11*, 745, doi:10.3390/diagnostics11050745.
69. Roth, G.A.; Abate, D.; Abate, K.H.; Abay, S.M.; Abbafati, C.; Abbasi, N.; Abbastabar, H.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Abdelalim, A.; et al. Global, Regional, and National Age-Sex-Specific Mortality for 282 Causes of Death in 195 Countries and Territories, 1980–2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **2018**, *392*, 1736–1788, doi:10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
70. Roth, G.A.; Forouzanfar, M.H.; Moran, A.E.; Barber, R.; Nguyen, G.; Feigin, V.L.; Naghavi, M.; Mensah, G.A.; Murray, C.J.L. Demographic and Epidemiologic Drivers of Global Cardiovascular Mortality. *N Engl J Med* **2015**, *372*, 1333–1341, doi:10.1056/NEJMoa1406656.
71. World Health Organization (WHO) Https://Www.Who.Int/News-Room/Fact-Sheets/Detail/Cardiovascular-Diseases-(Cvds)(accessed on 15 June 2021)
72. Joseph, P.; Leong, D.; McKee, M.; Anand, S.S.; Schwalm, J.-D.; Teo, K.; Mente, A.; Yusuf, S. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circ Res* **2017**, *121*, 677–694, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.308903.
73. Virani, S.S.; Alonso, A.; Aparicio, H.J.; Benjamin, E.J.; Bittencourt, M.S.; Callaway, C.W.; Carson, A.P.; Chamberlain, A.M.; Cheng, S.; Delling, F.N.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **2021**, *143*, doi:10.1161/CIR.0000000000000950.
74. Mesa, F.; Magan-Fernandez, A.; Castellino, G.; Chianetta, R.; Nibali, L.; Rizzo, M. Periodontitis and Mechanisms of Cardiometabolic Risk: Novel Insights and Future Perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2019**, *1865*, 476–484, doi:10.1016/j.bbadis.2018.12.001.
75. Pietiäinen, M.; Liljestrand, J.M.; Kopra, E.; Pussinen, P.J. Mediators between Oral Dysbiosis and Cardiovascular Diseases. *Eur J Oral Sci* **2018**, *126*, 26–36, doi:10.1111/eos.12423.
76. Libby, P.; Buring, J.E.; Badimon, L.; Hansson, G.K.; Deanfield, J.; Bittencourt, M.S.; Tokgözoğlu, L.; Lewis, E.F. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* **2019**, *5*, 56, doi:10.1038/s41572-019-0106-z.
77. Mattila, K.J.; Nieminen, M.S.; Valtonen, V.V.; Rasi, V.P.; Kesäniemi, Y.A.; Syrjälä, S.L.; Jungell, P.S.; Isoluoma, M.; Hietaniemi, K.; Jokinen, M.J. Association between Dental Health and Acute Myocardial Infarction. *BMJ* **1989**, *298*, 779–781, doi:10.1136/bmj.298.6676.779.
78. Tonetti, M.S.; Van Dyke, T.E.; working group 1 of the joint EFP/AAP workshop Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Consensus Report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* **2013**, *40*, S24–S29, doi:10.1111/jcpe.12089.
79. Lockhart, P.B.; Bolger, A.F.; Papapanou, P.N.; Osinbowale, O.; Trevisan, M.; Levison, M.E.; Taubert, K.A.; Newburger, J.W.; Gornik, H.L.; Gewitz, M.H.; et al. Periodontal Disease and Atherosclerotic Vascular Disease: Does the Evidence Support an Independent Association?: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **2012**, *125*, 2520–2544, doi:10.1161/CIR.0b013e31825719f3.
80. Sanz, M.; Marco Del Castillo, A.; Jepsen, S.; Gonzalez-Juanatey, J.R.; D'Aiuto, F.; Bouchard, P.; Chapple, I.; Dietrich, T.; Gotsman, I.; Graziani, F.; et al. Periodontitis and Cardiovascular Diseases: Consensus Report. *J Clin Periodontol* **2020**, *47*, 268–288, doi:10.1111/jcpe.13189.
81. Larvin, H.; Kang, J.; Aggarwal, V.R.; Pavitt, S.; Wu, J. Risk of Incident Cardiovascular Disease in People with Periodontal Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Exp Dent Res* **2021**, *7*, 109–122, doi:10.1002/cre2.336.
82. Tonetti, M.S.; D'Aiuto, F.; Nibali, L.; Donald, A.; Storry, C.; Parkar, M.; Suvan, J.; Hingorani, A.D.; Vallance, P.; Deanfield, J. Treatment of Periodontitis and Endothelial Function. *N Engl J Med* **2007**, *356*, 911–920, doi:10.1056/NEJMoa063186.
83. Roca-Millan, E.; Gonzalez-Navarro, B.; Sabater-Recolons, M.; Mari-Roig, A.; Jane-Salas, E.; Lopez-Lopez, J. Periodontal Treatment on Patients with Cardiovascular Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Med Oral* **2018**, 0–0, doi:10.4317/medoral.22725.
84. Sharma, S.; Sridhar, S.; McIntosh, A.; Messow, C.-M.; Aguilera, E.M.; Del Pinto, R.; Pietropaoli, D.; Gorska, R.; Siedlinski, M.; Maffia, P.; et al. Periodontal Therapy and Treatment of Hypertension-Alternative to the Pharmacological Approach. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pharmacological Research* **2021**, *166*, 105511, doi:10.1016/j.phrs.2021.105511.
85. Lobo, M.G.; Schmidt, M.M.; Lopes, R.D.; Dipp, T.; Feijó, I.P.; Schmidt, K.E.S.; Gazeta, C.A.; Azeredo, M.L.; Markoski, M.; Pellanda, L.C.; et al. Treating Periodontal Disease in Patients with Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *European Journal of Internal Medicine* **2020**, *71*, 76–80, doi:10.1016/j.ejim.2019.08.012.

86. Mahendra, J.; Mahendra, L.; Nagarajan, A.; Mathew, K. Prevalence of Eight Putative Periodontal Pathogens in Atherosclerotic Plaque of Coronary Artery Disease Patients and Comparing Them with Noncardiac Subjects: A Case-Control Study. *Indian J Dent Res* **2015**, *26*, 189, doi:10.4103/0970-9290.159164.
87. Pavlic, V.; Peric, D.; Kalezic, I.S.; Madi, M.; Bhat, S.G.; Brkic, Z.; Staletovic, D. Identification of Periopathogens in Atheromatous Plaques Obtained from Carotid and Coronary Arteries. *BioMed Research International* **2021**, *2021*, 1–7, doi:10.1155/2021/9986375.
88. Figuero, E.; Sánchez-Beltrán, M.; Cuesta-Frechoso, S.; Tejerina, J.M.; del Castro, J.A.; Gutiérrez, J.M.; Herrera, D.; Sanz, M. Detection of Periodontal Bacteria in Atheromatous Plaque by Nested Polymerase Chain Reaction. *Journal of Periodontology* **2011**, *82*, 1469–1477, doi:10.1902/jop.2011.100719.
89. Chhibber-Goel, J.; Singhal, V.; Bhowmik, D.; Vivek, R.; Parakh, N.; Bhargava, B.; Sharma, A. Linkages between Oral Commensal Bacteria and Atherosclerotic Plaques in Coronary Artery Disease Patients. *npj Biofilms Microbiomes* **2016**, *2*, 7, doi:10.1038/s41522-016-0009-7.
90. Straka, M.; Kazar, J.; Pijak, M.R.; Gasparovic, J.; Wsolova, L.; Mongiellova, V. The Importance of the Presence of Aggregatibacter Actinomycetemcomitans in Sulcus Gingivalis of Patients with Cardiovascular Diseases. *Med Sci Monit* **2011**, *17*, CR646-649, doi:10.12659/msm.882050.
91. Ghizoni, J.S.; Taveira, L.A. de A.; Garlet, G.P.; Ghizoni, M.F.; Pereira, J.R.; Dionísio, T.J.; Brozoski, D.T.; Santos, C.F.; Sant'Ana, A.C.P. Increased Levels of Porphyromonas Gingivalis Are Associated with Ischemic and Hemorrhagic Cerebrovascular Disease in Humans: An in Vivo Study. *J. Appl. Oral Sci.* **2012**, *20*, 104–112, doi:10.1590/S1678-77572012000100019.
92. Koren, O.; Spor, A.; Felin, J.; Fak, F.; Stombaugh, J.; Tremaroli, V.; Behre, C.J.; Knight, R.; Fagerberg, B.; Ley, R.E.; et al. Human Oral, Gut, and Plaque Microbiota in Patients with Atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 4592–4598, doi:10.1073/pnas.1011383107.
93. Mougeot, J.-L.C.; Stevens, C.B.; Paster, B.J.; Brennan, M.T.; Lockhart, P.B.; Mougeot, F.K.B. *Porphyromonas Gingivalis* Is the Most Abundant Species Detected in Coronary and Femoral Arteries. *Journal of Oral Microbiology* **2017**, *9*, 1281562, doi:10.1080/20002297.2017.1281562.
94. Oliveira, F.A.F.; Forte, C.P.F.; Silva, P.G. de B.; Lopes, C.B.; Montenegro, R.C.; Santos, Â.K.C.R. dos; Sobrinho, C.R.M.R.; Mota, M.R.L.; Sousa, F.B.; Alves, A.P.N.N. Molecular Analysis of Oral Bacteria in Heart Valve of Patients With Cardiovascular Disease by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Medicine* **2015**, *94*, e2067, doi:10.1097/MD.0000000000002067.
95. Pereira, R.B.; Vasquez, E.C.; Stefanon, I.; Meyrelles, S.S. Oral P. Gingivalis Infection Alters the Vascular Reactivity in Healthy and Spontaneously Atherosclerotic Mice. *Lipids Health Dis* **2011**, *10*, 80, doi:10.1186/1476-511X-10-80.
96. Miyauchi, S.; Maekawa, T.; Aoki, Y.; Miyazawa, H.; Tabeta, K.; Nakajima, T.; Yamazaki, K. Oral Infection with Porphyromonas Gingivalis and Systemic Cytokine Profile in C57BL/6.KOR-ApoEshl Mice: Cytokine Profiling in C57BL/6.KOR-ApoEshlmice. *Journal of Periodontal Research* **2012**, *47*, 402–408, doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01441.x.
97. Hokamura, K.; Inaba, H.; Nakano, K.; Nomura, R.; Yoshioka, H.; Taniguchi, K.; Ooshima, T.; Wada, K.; Amano, A.; Umemura, K. Molecular Analysis of Aortic Intimal Hyperplasia Caused by *Porphyromonas Gingivalis* Infection in Mice with Endothelial Damage. *Journal of Periodontal Research* **2010**, *45*, 337–344, doi:10.1111/j.1600-0765.2009.01242.x.
98. Chukkapalli, S.S.; Rivera, M.F.; Velsko, I.M.; Lee, J.-Y.; Chen, H.; Zheng, D.; Bhattacharyya, I.; Gangula, P.R.; Lucas, A.R.; Kesavalu, L. Invasion of Oral and Aortic Tissues by Oral Spirochete Treponema Denticola in ApoE $^{-/-}$ Mice Causally Links Periodontal Disease and Atherosclerosis. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 1959–1967, doi:10.1128/IAI.01511-14.
99. Lee, H.-R.; Jun, H.-K.; Kim, H.-D.; Lee, S.-H.; Choi, B.-K. Fusobacterium Nucleatum GroEL Induces Risk Factors of Atherosclerosis in Human Microvascular Endothelial Cells and ApoE−/− Mice: Fusobacterium Nucleatum GroEL and Atherosclerosis. *Molecular Oral Microbiology* **2012**, *27*, 109–123, doi:10.1111/j.2041-1014.2011.00636.x.
100. Velsko, I.M.; Chukkapalli, S.S.; Rivera-Kweh, M.F.; Zheng, D.; Aukhil, I.; Lucas, A.R.; Larjava, H.; Kesavalu, L. Periodontal Pathogens Invade Gingiva and Aortic Adventitia and Elicit Inflammasome Activation in Avβ6 Integrin-Deficient Mice. *Infect Immun* **2015**, *83*, 4582–4593, doi:10.1128/IAI.01077-15.
101. Chukkapalli, S.S.; Velsko, I.M.; Rivera-Kweh, M.F.; Zheng, D.; Lucas, A.R.; Kesavalu, L. Polymicrobial Oral Infection with Four Periodontal Bacteria Orchestrates a Distinct Inflammatory Response and Atherosclerosis in ApoEnull Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143291, doi:10.1371/journal.pone.0143291.
102. Farrugia, C.; Stafford, G.P.; Potempa, J.; Wilkinson, R.N.; Chen, Y.; Murdoch, C.; Widziolek, M. Mechanisms of Vascular Damage by Systemic Dissemination of the Oral Pathogen *Porphyromonas Gingivalis*. *FEBS J.* **2021**, *288*, 1479–1495, doi:10.1111/febs.15486.
103. Schenkein, H.A.; Loos, B.G. Inflammatory Mechanisms Linking Periodontal Diseases to Cardiovascular Diseases. *J Clin Periodontol* **2013**, *40*, S51–S69, doi:10.1111/jcpe.12060.
104. Pussinen, P.J.; Vilkuna-Rautiainen, T.; Alfthan, G.; Palosuo, T.; Jauhiainen, M.; Sundvall, J.; Vesanen, M.; Mattila, K.; Asikainen, S. Severe Periodontitis Enhances Macrophage Activation via Increased Serum Lipopolysaccharide. *ATVB* **2004**, *24*, 2174–2180, doi:10.1161/01.ATV.0000145979.82184.9f.
105. Caúla, A.L.; Lira-Junior, R.; Tinoco, E.M.B.; Fischer, R.G. The Effect of Periodontal Therapy on Cardiovascular Risk Markers: A 6-Month Randomized Clinical Trial. *J Clin Periodontol* **2014**, *41*, 875–882, doi:10.1111/jcpe.12290.
106. Zeigler, C.C.; Wondimu, B.; Marcus, C.; Modéer, T. Pathological Periodontal Pockets Are Associated with Raised Diastolic Blood Pressure in Obese Adolescents. *BMC Oral Health* **2015**, *15*, 41, doi:10.1186/s12903-015-0026-6.
107. Stoll, L.L.; Denning, G.M.; Weintraub, N.L. Potential Role of Endotoxin as a Proinflammatory Mediator of Atherosclerosis. *ATVB* **2004**, *24*, 2227–2236, doi:10.1161/01.ATV.0000147534.69062.dc.

108. Amar, S.; Gokce, N.; Morgan, S.; Loukideli, M.; Van Dyke, T.E.; Vita, J.A. Periodontal Disease Is Associated With Brachial Artery Endothelial Dysfunction and Systemic Inflammation. *ATVB* **2003**, *23*, 1245–1249, doi:10.1161/01.ATV.0000078603.90302.4A.
109. Kallio, K.A.E.; Hyvärinen, K.; Kovanen, P.T.; Jauhiainen, M.; Pussinen, P.J. Very Low Density Lipoproteins Derived from Periodontitis Patients Facilitate Macrophage Activation via Lipopolysaccharide Function. *Metabolism* **2013**, *62*, 661–668, doi:10.1016/j.metabol.2012.09.015.
110. Rufail, M.L.; Schenkein, H.A.; Koertge, T.E.; Best, A.M.; Barbour, S.E.; Tew, J.G.; van Antwerpen, R. Atherogenic Lipoprotein Parameters in Patients with Aggressive Periodontitis. *J Periodontal Res* **2007**, *42*, 495–502, doi:10.1111/j.1600-0765.2007.00973.x.
111. Rizzo, M.; Banach, M.; Montalto, G.; Mikhailidis, D.P. Lipid-Lowering Therapies and Achievement of LDL-Cholesterol Targets. *Arch Med Sci* **2012**, *8*, 598–600, doi:10.5114/aoms.2012.30281.
112. Chotirmall, S.H.; Gellatly, S.L.; Budden, K.F.; Mac Aogáin, M.; Shukla, S.D.; Wood, D.L.A.; Hugenholtz, P.; Pethe, K.; Hansbro, P.M. Microbiomes in Respiratory Health and Disease: An Asia-Pacific Perspective: Microbiomes in Respiratory Health. *Respirology* **2017**, *22*, 240–250, doi:10.1111/resp.12971.
113. Bassis, C.M.; Erb-Downward, J.R.; Dickson, R.P.; Freeman, C.M.; Schmidt, T.M.; Young, V.B.; Beck, J.M.; Curtis, J.L.; Huffnagle, G.B. Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *mBio* **2015**, *6*, doi:10.1128/mBio.00037-15.
114. Shukla, S.D.; Budden, K.F.; Neal, R.; Hansbro, P.M. Microbiome Effects on Immunity, Health and Disease in the Lung. *Clin Trans Immunol* **2017**, *6*, e133, doi:10.1038/cti.2017.6.
115. Huffnagle, G.B.; Dickson, R.P.; Lukacs, N.W. The Respiratory Tract Microbiome and Lung Inflammation: A Two-Way Street. *Mucosal Immunol* **2017**, *10*, 299–306, doi:10.1038/mi.2016.108.
116. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. 2019. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: 2019 Report. Https://Goldcopd.Org/Gold-Reports/(accessed on 15 June 2021).
117. Budden, K.F.; Shukla, S.D.; Rehman, S.F.; Bowerman, K.L.; Keely, S.; Hugenholtz, P.; Armstrong-James, D.P.H.; Adcock, I.M.; Chotirmall, S.H.; Chung, K.F.; et al. Functional Effects of the Microbiota in Chronic Respiratory Disease. *The Lancet Respiratory Medicine* **2019**, *7*, 907–920, doi:10.1016/S2213-2600(18)30510-1.
118. Sethi, S.; Murphy, T.F. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* **2008**, *359*, 2355–2365, doi:10.1056/NEJMra0800353.
119. Górska, K.; Paplińska-Goryca, M.; Nejman-Gryz, P.; Goryca, K.; Krenke, R. Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in the Phenotyping of Mild-to-Moderate Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **2017**, *14*, 181–189, doi:10.1080/15412555.2016.1260539.
120. Ko, F.W.; Chan, K.P.; Hui, D.S.; Goddard, J.R.; Shaw, J.G.; Reid, D.W.; Yang, I.A. Acute Exacerbation of COPD: Hot Topics on Acute Exacerbation of COPD. *Respirology* **2016**, *21*, 1152–1165, doi:10.1111/resp.12780.
121. Moghoofei, M.; Azimzadeh Jamalkandi, S.; Moein, M.; Salimian, J.; Ahmadi, A. Bacterial Infections in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infection* **2020**, *48*, 19–35, doi:10.1007/s15010-019-01350-1.
122. Tan, L.; Wang, H.; Li, C.; Pan, Y. 16S RDNA-Based Metagenomic Analysis of Dental Plaque and Lung Bacteria in Patients with Severe Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Periodont Res* **2014**, *49*, 760–769, doi:10.1111/jre.12159.
123. Zeng, X.-T.; Tu, M.-L.; Liu, D.-Y.; Zheng, D.; Zhang, J.; Leng, W. Periodontal Disease and Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46508, doi:10.1371/journal.pone.0046508.
124. Takeuchi, K.; Matsumoto, K.; Furuta, M.; Fukuyama, S.; Takeshita, T.; Ogata, H.; Suma, S.; Shibata, Y.; Shimazaki, Y.; Hata, J.; et al. Periodontitis Is Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Dent Res* **2019**, *98*, 534–540, doi:10.1177/0022034519833630.
125. Kucukcoskun, M.; Baser, U.; Oztekin, G.; Kiyan, E.; Yalcin, F. Initial Periodontal Treatment for Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations. *Journal of Periodontology* **2013**, *84*, 863–870, doi:10.1902/jop.2012.120399.
126. Zhou, X.; Han, J.; Liu, Z.; Song, Y.; Wang, Z.; Sun, Z. Effects of Periodontal Treatment on Lung Function and Exacerbation Frequency in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Chronic Periodontitis: A 2-Year Pilot Randomized Controlled Trial. *J Clin Periodontol* **2014**, *41*, 564–572, doi:10.1111/jcpe.12247.
127. The Periodontopathic Bacterium Fusobacterium Nucleatum Induced Proinflammatory Cytokine Production by Human Respiratory Epithelial Cell Lines and in the Lower Respiratory Organs in Mice. *Cell Physiol Biochem* **2019**, *53*, 49–61, doi:10.33594/000000120.
128. Li, Q.; Tan, L.; Wang, H.; Kou, Y.; Shi, X.; Zhang, S.; Pan, Y. *Fusobacterium Nucleatum* Interaction with *Pseudomonas Aeruginosa* Induces Biofilm-Associated Antibiotic Tolerance via *Fusobacterium* Adhesin A. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1686–1696, doi:10.1021/acsinfecdis.9b00402.
129. Li, Q.; Wang, H.; Tan, L.; Zhang, S.; Lin, L.; Tang, X.; Pan, Y. Oral Pathogen Fusobacterium Nucleatum Coaggregates With Pseudomonas Aeruginosa to Modulate the Inflammatory Cytotoxicity of Pulmonary Epithelial Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 643913, doi:10.3389/fcimb.2021.643913.
130. Marouf, N.; Cai, W.; Said, K.N.; Daas, H.; Diab, H.; Chinta, V.R.; Hssain, A.A.; Nicolau, B.; Sanz, M.; Tamimi, F. Association between Periodontitis and Severity of COVID-19 Infection: A Case–Control Study. *J Clin Periodontol* **2021**, *48*, 483–491, doi:10.1111/jcpe.13435.

131. Takahashi, Y.; Watanabe, N.; Kamio, N.; Yokoe, S.; Suzuki, R.; Sato, S.; Iinuma, T.; Imai, K. Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 and Proinflammatory Cytokines Induced by the Periodontopathic Bacterium Fusobacterium Nucleatum in Human Respiratory Epithelial Cells. *IJMS* **2021**, *22*, 1352, doi:10.3390/ijms22031352.
132. Mercado, F.; Marshall, R.I.; Klestov, A.C.; Bartold, P.M. Is There a Relationship between Rheumatoid Arthritis and Periodontal Disease? *Journal of Clinical Periodontology* **2000**, *27*, 267–272, doi:10.1034/j.1600-051x.2000.027004267.x.
133. Smolen, J.S.; Aletaha, D.; McInnes, I.B. Rheumatoid Arthritis. *The Lancet* **2016**, *388*, 2023–2038, doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
134. Anquetil, F.; Clavel, C.; Offer, G.; Serre, G.; Sebbag, M. IgM and IgA Rheumatoid Factors Purified from Rheumatoid Arthritis Sera Boost the Fc Receptor– and Complement-Dependent Effector Functions of the Disease-Specific Anti–Citrullinated Protein Autoantibodies. *J.I.* **2015**, *194*, 3664–3674, doi:10.4049/jimmunol.1402334.
135. McInnes, I.B.; Schett, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* **2011**, *365*, 2205–2219, doi:10.1056/NEJMra1004965.
136. Nielen, M.M.J.; van Schaardenburg, D.; Reesink, H.W.; van de Stadt, R.J.; van der Horst-Bruinsma, I.E.; de Koning, M.H.M.T.; Habibuw, M.R.; Vandenbroucke, J.P.; Dijkmans, B.A.C. Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis: A Study of Serial Measurements in Blood Donors. *Arthritis & Rheumatism* **2004**, *50*, 380–386, doi:10.1002/art.20018.
137. Arkema, E.V.; Goldstein, B.L.; Robinson, W.; Sokolove, J.; Wagner, C.A.; Malspeis, S.; Rosner, B.; Grodstein, F.; Karlson, E.W.; Costenbader, K.H. Anti-Citrullinated Peptide Autoantibodies, Human Leukocyte Antigen Shared Epitope and Risk of Future Rheumatoid Arthritis: A Nested Case–Control Study. *Arthritis Res Ther* **2013**, *15*, R159, doi:10.1186/ar4342.
138. Muller, S.; Radic, M. Citrullinated Autoantigens: From Diagnostic Markers to Pathogenetic Mechanisms. *Clinic Rev Allerg Immunol* **2015**, *49*, 232–239, doi:10.1007/s12016-014-8459-2.
139. de Pablo, P.; Dietrich, T.; McAlindon, T.E. Association of Periodontal Disease and Tooth Loss with Rheumatoid Arthritis in the US Population. *J Rheumatol* **2008**, *35*, 70–76.
140. Volkov, M.; Schie, K.A.; Woude, D. Autoantibodies and B Cells: The ABC of Rheumatoid Arthritis Pathophysiology. *Immunol Rev* **2020**, *294*, 148–163, doi:10.1111/imr.12829.
141. Eriksson, K.; Fei, G.; Lundmark, A.; Benchimol, D.; Lee, L.; Hu, Y.O.O.; Kats, A.; Saevarsdottir, S.; Catrina, A.I.; Klinge, B.; et al. Periodontal Health and Oral Microbiota in Patients with Rheumatoid Arthritis. *JCM* **2019**, *8*, 630, doi:10.3390/jcm8050630.
142. Fuggle, N.R.; Smith, T.O.; Kaul, A.; Sofat, N. Hand to Mouth: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fimmu.2016.00080.
143. Jepsen, S.; Caton, J.G.; Albandar, J.M.; Bissada, N.F.; Bouchard, P.; Cortellini, P.; Demirel, K.; de Sanctis, M.; Ercoli, C.; Fan, J.; et al. Periodontal Manifestations of Systemic Diseases and Developmental and Acquired Conditions: Consensus Report of Workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions: Classification and Case Definitions for Periodontal Manifestations of Systemic Diseases and Developmental and Acquired Conditions. *J Clin Periodontol* **2018**, *45*, S219–S229, doi:10.1111/jcpe.12951.
144. Silvestre-Rangil, J.; Bagán, L.; Silvestre, F.J.; Bagán, J.V. Oral Manifestations of Rheumatoid Arthritis. A Cross-Sectional Study of 73 Patients. *Clin Oral Invest* **2016**, *20*, 2575–2580, doi:10.1007/s00784-016-1745-z.
145. Schwenzer, A.; Quirke, A.; Marzeda, A.M.; Wong, A.; Montgomery, A.B.; Sayles, H.R.; Eick, S.; Gawron, K.; Chomyszyn-Gajewska, M.; Łazarz-Bartyzel, K.; et al. Association of Distinct Fine Specificities of Anti−Citrullinated Peptide Antibodies With Elevated Immune Responses to *Prevotella Intermedia* in a Subgroup of Patients With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *Arthritis Rheumatol* **2017**, *69*, 2303–2313, doi:10.1002/art.40227.
146. Mikuls, T.R.; Payne, J.B.; Yu, F.; Thiele, G.M.; Reynolds, R.J.; Cannon, G.W.; Markt, J.; McGowan, D.; Kerr, G.S.; Redman, R.S.; et al. Periodontitis and *Porphyromonas Gingivalis* in Patients With Rheumatoid Arthritis: Periodontitis and *P Gingivalis* in RA. *Arthritis & Rheumatology* **2014**, *66*, 1090–1100, doi:10.1002/art.38348.
147. Wegner, N.; Wait, R.; Sroka, A.; Eick, S.; Nguyen, K.-A.; Lundberg, K.; Kinloch, A.; Culshaw, S.; Potempa, J.; Venables, P.J. Peptidylarginine Deiminase from Porphyromonas Gingivalis Citrullinates Human Fibrinogen and α-Enolase: Implications for Autoimmunity in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **2010**, *62*, 2662–2672, doi:10.1002/art.27552.
148. Kharlamova, N.; Jiang, X.; Sherina, N.; Potempa, B.; Israelsson, L.; Quirke, A.-M.; Eriksson, K.; Yucel-Lindberg, T.; Venables, P.J.; Potempa, J.; et al. Antibodies to *Porphyromonas Gingivalis* Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology: *P GINGIVALIS* IN RA ETIOLOGY. *Arthritis & Rheumatology* **2016**, *68*, 604–613, doi:10.1002/art.39491.
149. Johansson, L.; Sherina, N.; Kharlamova, N.; Potempa, B.; Larsson, B.; Israelsson, L.; Potempa, J.; Rantapää-Dahlqvist, S.; Lundberg, K. Concentration of Antibodies against Porphyromonas Gingivalis Is Increased before the Onset of Symptoms of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res Ther* **2016**, *18*, 201, doi:10.1186/s13075-016-1100-4.
150. Konig, M.F.; Abusleme, L.; Reinholdt, J.; Palmer, R.J.; Teles, R.P.; Sampson, K.; Rosen, A.; Nigrovic, P.A.; Sokolove, J.; Giles, J.T.; et al. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans-Induced Hypercitrullination Links Periodontal Infection to Autoimmunity in Rheumatoid Arthritis. *Science Translational Medicine* **2016**, *8*, 369ra176-369ra176, doi:10.1126/scitranslmed.aaj1921.
151. Tong, Y.; Zheng, L.; Qing, P.; Zhao, H.; Li, Y.; Su, L.; Zhang, Q.; Zhao, Y.; Luo, Y.; Liu, Y. Oral Microbiota Perturbations Are Linked to High Risk for Rheumatoid Arthritis. *Front Cell Infect Microbiol* **2019**, *9*, 475, doi:10.3389/fcimb.2019.00475.
152. Feldmann, M.; Brennan, F.M.; Maini, R.N. Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Annu Rev Immunol* **1996**, *14*, 397–440, doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.397.

153. Armitage, G.C. Bi-Directional Relationship between Pregnancy and Periodontal Disease: *Relationship between Pregnancy and Periodontal Disease*. *Periodontology 2000* **2013**, *61*, 160–176, doi:10.1111/j.1600-0757.2011.00396.x.
154. Silva de Araujo Figueiredo, C.; Gonçalves Carvalho Rosalem, C.; Costa Cantanhede, A.L.; Abreu Fonseca Thomaz, É.B.; Fontoura Nogueira da Cruz, M.C. Systemic Alterations and Their Oral Manifestations in Pregnant Women: Immune, Endocrine, and Other Changes. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2017**, *43*, 16–22, doi:10.1111/jog.13150.
155. Miranda, L.A.; Islabão, A.G.; Fischer, R.G.; Figueredo, C.M.S.; Oppermann, R.V.; Gustafsson, A. Decreased Interleukin-1beta and Elastase in the Gingival Crevicular Fluid of Individuals Undergoing Anti-Inflammatory Treatment for Rheumatoid Arthritis. *J Periodontol* **2007**, *78*, 1612–1619, doi:10.1902/jop.2007.060520.
156. Sakaguchi, W.; To, M.; Yamamoto, Y.; Inaba, K.; Yakeishi, M.; Saruta, J.; Fuchida, S.; Hamada, N.; Tsukinoki, K. Detection of Anti-Citrullinated Protein Antibody (ACPA) in Saliva for Rheumatoid Arthritis Using DBA Mice Infected with Porphyromonas Gingivalis. *Archives of Oral Biology* **2019**, *108*, 104510, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.104510.
157. Teles, F.; Wang, Y.; Hajishengallis, G.; Hasturk, H.; Marchesan, J.T. Impact of Systemic Factors in Shaping the Periodontal Microbiome. *Periodontol 2000* **2021**, *85*, 126–160, doi:10.1111/prd.12356.
158. Figuero, E.; Carrillo-de-Albornoz, A.; Herrera, D.; Bascones-Martínez, A. Gingival Changes during Pregnancy: I. Influence of Hormonal Variations on Clinical and Immunological Parameters. *Journal of Clinical Periodontology* **2010**, *37*, 220–229, doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01516.x.
159. Balan, P.; Chong, Y.S.; Umashankar, S.; Swarup, S.; Loke, W.M.; Lopez, V.; He, H.G.; Seneviratne, C.J. Keystone Species in Pregnancy Gingivitis: A Snapshot of Oral Microbiome During Pregnancy and Postpartum Period. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2360, doi:10.3389/fmicb.2018.02360.
160. Sanz, M.; Kornman, K.; on behalf of working group 3 of the joint EFP/AAP workshop Periodontitis and Adverse Pregnancy Outcomes: Consensus Report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Periodontology* **2013**, *84*, S164–S169, doi:10.1902/jop.2013.1340016.
161. Boggess, K. Maternal Periodontal Disease Is Associated with an Increased Risk for Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology* **2003**, *101*, 227–231, doi:10.1016/S0029-7844(02)02314-1.
162. Han, Y.W.; Fardini, Y.; Chen, C.; Iacampo, K.G.; Peraino, V.A.; Shamonki, J.M.; Redline, R.W. Term Stillbirth Caused by Oral Fusobacterium Nucleatum. *Obstetrics & Gynecology* **2010**, *115*, 442–445, doi:10.1097/AOG.0b013e3181cb9955.
163. He, M.; Migliori, A.R.; Lauro, P.; Sung, C.J.; Pinar, H. Perinatal Mortality Associated with Positive Postmortem Cultures for Common Oral Flora. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* **2017**, *2017*, 1–9, doi:10.1155/2017/9027918.
164. Komine-Aizawa, S.; Aizawa, S.; Hayakawa, S. Periodontal Diseases and Adverse Pregnancy Outcomes. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2019**, *45*, 5–12, doi:10.1111/jog.13782.
165. Cobb, C.; Kelly, P.; Williams, K.; Babbar, S.; Angolkar, M.; Derman, R. The Oral Microbiome and Adverse Pregnancy Outcomes. *IJWH* **2017**, *Volume 9*, 551–559, doi:10.2147/IJWH.S142730.
166. Aagaard, K.; Ma, J.; Antony, K.M.; Ganu, R.; Petrosino, J.; Versalovic, J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine* **2014**, *6*, 237ra65-237ra65, doi:10.1126/scitranslmed.3008599.
167. Fischer, L.A.; Demerath, E.; Bittner-Eddy, P.; Costalonga, M. Placental Colonization with Periodontal Pathogens: The Potential Missing Link. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **2019**, *221*, 383-392.e3, doi:10.1016/j.ajog.2019.04.029.
168. Fardini, Y.; Chung, P.; Dumm, R.; Joshi, N.; Han, Y.W. Transmission of Diverse Oral Bacteria to Murine Placenta: Evidence for the Oral Microbiome as a Potential Source of Intrauterine Infection. *Infect Immun* **2010**, *78*, 1789–1796, doi:10.1128/IAI.01395-09.
169. Vanterpool, S.F.; Been, J.V.; Houben, M.L.; Nikkels, P.G.J.; De Krijger, R.R.; Zimmermann, L.J.I.; Kramer, B.W.; Progulske-Fox, A.; Reyes, L. Porphyromonas Gingivalis within Placental Villous Mesenchyme and Umbilical Cord Stroma Is Associated with Adverse Pregnancy Outcome. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146157, doi:10.1371/journal.pone.0146157.
170. Barak, S.; Oettinger-Barak, O.; Machtei, E.E.; Sprecher, H.; Ohel, G. Evidence of Periopathogenic Microorganisms in Placentas of Women With Preeclampsia. *Journal of Periodontology* **2007**, *78*, 670–676, doi:10.1902/jop.2007.060362.
171. Ramadugu, K.; Bhaumik, D.; Luo, T.; Gicquelais, R.E.; Lee, K.H.; Stafford, E.B.; Marrs, C.F.; Neiswanger, K.; McNeil, D.W.; Marazita, M.L.; et al. Maternal Oral Health Influences Infant Salivary Microbiome. *J Dent Res* **2021**, *100*, 58–65, doi:10.1177/0022034520947665.
172. Sartor, R.B. Mechanisms of Disease: Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2006**, *3*, 390–407, doi:10.1038/ncpgasthep0528.
173. Jang, H.-J.; Kang, B.; Choe, B.-H. The Difference in Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease for Children and Adults. *Transl Pediatr* **2019**, *8*, 4–15, doi:10.21037/tp.2019.01.06.
174. Mortada, I.; Leone, A.; Gerges Geagea, A.; Mortada, R.; Matar, C.; Rizzo, M.; Hajj Hussein, I.; Massaad-Massade, L.; Jurjus, A. Oral Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *J Biol Regul Homeost Agents* **2017**, *31*, 817–821.
175. Thomas, C.; Dimmock, M.; Gilletta de Saint-Joseph, C.; Barres, B.; Paul, C.; Cousty, S.; Laurencin-Dalicieux, S. How Oral Specialists Can Help Diagnose and Manage Extra-Digestive Inflammatory Bowel Disease Complications. *Case Rep Gastroenterol* **2021**, *15*, 276–281, doi:10.1159/000513156.
176. Muhvić-Urek, M.; Tomac-Stojmenović, M.; Mijandrušić-Sinčić, B. Oral Pathology in Inflammatory Bowel Disease. *WJG* **2016**, *22*, 5655, doi:10.3748/wjg.v22.i25.5655.
177. Manichanh, C. Reduced Diversity of Faecal Microbiota in Crohn's Disease Revealed by a Metagenomic Approach. *Gut* **2006**, *55*, 205–211, doi:10.1136/gut.2005.073817.

178. Ott, S.J. Reduction in Diversity of the Colonic Mucosa Associated Bacterial Microflora in Patients with Active Inflammatory Bowel Disease. *Gut* **2004**, *53*, 685–693, doi:10.1136/gut.2003.025403.
179. Prosberg, M.; Bendtsen, F.; Vind, I.; Petersen, A.M.; Gluud, L.L. The Association between the Gut Microbiota and the Inflammatory Bowel Disease Activity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **2016**, *51*, 1407–1415, doi:10.1080/00365521.2016.1216587.
180. She, Y.; Kong, X.; Ge, Y.; Liu, Z.; Chen, J.; Jiang, J.; Jiang, H.; Fang, S. Periodontitis and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *BMC Oral Health* **2020**, *20*, 67, doi:10.1186/s12903-020-1053-5.
181. Zhang, Y.; Qiao, D.; Chen, R.; Zhu, F.; Gong, J.; Yan, F. The Association between Periodontitis and Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Research International* **2021**, *2021*, 1–8, doi:10.1155/2021/6692420.
182. Said, H.S.; Suda, W.; Nakagome, S.; Chinen, H.; Oshima, K.; Kim, S.; Kimura, R.; Iraha, A.; Ishida, H.; Fujita, J.; et al. Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers. *DNA Research* **2014**, *21*, 15–25, doi:10.1093/dnares/dst037.
183. Schmidt, J.; Weigert, M.; Leuschner, C.; Hartmann, H.; Raddatz, D.; Haak, R.; Mausberg, R.F.; Kottmann, T.; Schmalz, G.; Ziebolz, D. Active Matrix Metalloproteinase-8 and Periodontal Bacteria-Interlink between Periodontitis and Inflammatory Bowel Disease? *J Periodontol* **2018**, *89*, 699–707, doi:10.1002/JPER.17-0486.
184. Xun, Z.; Zhang, Q.; Xu, T.; Chen, N.; Chen, F. Dysbiosis and Ecotypes of the Salivary Microbiome Associated With Inflammatory Bowel Diseases and the Assistance in Diagnosis of Diseases Using Oral Bacterial Profiles. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 1136, doi:10.3389/fmicb.2018.01136.
185. Brito, F.; Zaltman, C.; Carvalho, A.T.P.; Fischer, R.G.; Persson, R.; Gustafsson, A.; Figueredo, C.M.S. Subgingival Microflora in Inflammatory Bowel Disease Patients with Untreated Periodontitis: *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **2013**, *25*, 239–245, doi:10.1097/MEG.0b013e32835a2b70.
186. Van Dyke, T.E.; Dowell, V.R.; Offenbacher, S.; Snyder, W.; Hersh, T. Potential Role of Microorganisms Isolated from Periodontal Lesions in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Infect Immun* **1986**, *53*, 671–677, doi:10.1128/iai.53.3.671-677.1986.
187. Zhang, T.; Kayani, M. ur R.; Hong, L.; Zhang, C.; Zhong, J.; Wang, Z.; Chen, L. Dynamics of the Salivary Microbiome During Different Phases of Crohn's Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 544704, doi:10.3389/fcimb.2020.544704.
188. Kitamoto, S.; Nagao-Kitamoto, H.; Hein, R.; Schmidt, T.M.; Kamada, N. The Bacterial Connection between the Oral Cavity and the Gut Diseases. *J Dent Res* **2020**, *99*, 1021–1029, doi:10.1177/0022034520924633.
189. Li, B.; Ge, Y.; Cheng, L.; Zeng, B.; Yu, J.; Peng, X.; Zhao, J.; Li, W.; Ren, B.; Li, M.; et al. Oral Bacteria Colonize and Compete with Gut Microbiota in Gnotobiotic Mice. *Int J Oral Sci* **2019**, *11*, 10, doi:10.1038/s41368-018-0043-9.
190. Huh, J.-W.; Roh, T.-Y. Opportunistic Detection of Fusobacterium Nucleatum as a Marker for the Early Gut Microbial Dysbiosis. *BMC Microbiol* **2020**, *20*, 208, doi:10.1186/s12866-020-01887-4.
191. Kitamoto, S.; Nagao-Kitamoto, H.; Jiao, Y.; Gillilland, M.G.; Hayashi, A.; Imai, J.; Sugihara, K.; Miyoshi, M.; Brazil, J.C.; Kuffa, P.; et al. The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. *Cell* **2020**, *182*, 447-462.e14, doi:10.1016/j.cell.2020.05.048.
192. Nakajima, M.; Arimatsu, K.; Kato, T.; Matsuda, Y.; Minagawa, T.; Takahashi, N.; Ohno, H.; Yamazaki, K. Oral Administration of P. Gingivalis Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134234, doi:10.1371/journal.pone.0134234.
193. Kobayashi, R.; Ogawa, Y.; Hashizume-Takizawa, T.; Kurita-Ochiai, T. Oral Bacteria Affect the Gut Microbiome and Intestinal Immunity. *Pathogens and Disease* **2020**, *78*, ftaa024, doi:10.1093/femspd/ftaa024.
194. Atarashi, K.; Suda, W.; Luo, C.; Kawaguchi, T.; Motoo, I.; Narushima, S.; Kiguchi, Y.; Yasuma, K.; Watanabe, E.; Tanoue, T.; et al. Ectopic Colonization of Oral Bacteria in the Intestine Drives T H 1 Cell Induction and Inflammation. *Science* **2017**, *358*, 359–365, doi:10.1126/science.aan4526.
195. Allen, M.; Wang, X.; Burgess, J.D.; Watzlawik, J.; Serie, D.J.; Younkin, C.S.; Nguyen, T.; Malphrus, K.G.; Lincoln, S.; Carrasquillo, M.M.; et al. Conserved Brain Myelination Networks Are Altered in Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases. *Alzheimer's & Dementia* **2018**, *14*, 352–366, doi:10.1016/j.jalz.2017.09.012.
196. Alzheimer's Association 2018 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia* **2018**, *14*, 367–429, doi:10.1016/j.jalz.2018.02.001.
197. Condello, C.; Stöehr, J. Aβ Propagation and Strains: Implications for the Phenotypic Diversity in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Disease* **2018**, *109*, 191–200, doi:10.1016/j.nbd.2017.03.014.
198. Shao, Q.; Zhang, X.; Yang, P.; Yuan, Y.; Chen, N. Amyloidogenic Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases Activate the NLRP3 Inflammasome. *International Immunopharmacology* **2017**, *49*, 155–160, doi:10.1016/j.intimp.2017.05.027.
199. Rosenberg, A.; Ngandu, T.; Rusanen, M.; Antikainen, R.; Bäckman, L.; Havulinna, S.; Hänninen, T.; Laatikainen, T.; Lehtisalo, J.; Levälahti, E.; et al. Multidomain Lifestyle Intervention Benefits a Large Elderly Population at Risk for Cognitive Decline and Dementia Regardless of Baseline Characteristics: The FINGER Trial. *Alzheimer's & Dementia* **2018**, *14*, 263–270, doi:10.1016/j.jalz.2017.09.006.
200. Harding, A.; Gonder, U.; Robinson, S.J.; Crean, S.; Singhrao, S.K. Exploring the Association between Alzheimer's Disease, Oral Health, Microbial Endocrinology and Nutrition. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 398, doi:10.3389/fnagi.2017.00398.
201. Chen, C.-K.; Wu, Y.-T.; Chang, Y.-C. Association between Chronic Periodontitis and the Risk of Alzheimer's Disease: A Retrospective, Population-Based, Matched-Cohort Study. *Alz Res Therapy* **2017**, *9*, 56, doi:10.1186/s13195-017-0282-6.

202. Kamer, A.R.; Craig, R.G.; Niederman, R.; Fortea, J.; de Leon, M.J. Periodontal Disease as a Possible Cause for Alzheimer's Disease. *Periodontol 2000* **2020**, *83*, 242–271, doi:10.1111/prd.12327.
203. Liu, X.-X.; Jiao, B.; Liao, X.-X.; Guo, L.-N.; Yuan, Z.-H.; Wang, X.; Xiao, X.-W.; Zhang, X.-Y.; Tang, B.-S.; Shen, L. Analysis of Salivary Microbiome in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **2019**, *72*, 633–640, doi:10.3233/JAD-190587.
204. Sparks Stein, P.; Steffen, M.J.; Smith, C.; Jicha, G.; Ebersole, J.L.; Abner, E.; Dawson, D. Serum Antibodies to Periodontal Pathogens Are a Risk Factor for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's & Dementia* **2012**, *8*, 196–203, doi:10.1016/j.jalz.2011.04.006.
205. Maitre, Y.; Micheneau, P.; Delpierre, A.; Mahalli, R.; Guerin, M.; Amador, G.; Denis, F. Did the Brain and Oral Microbiota Talk to Each Other? A Review of the Literature. *JCM* **2020**, *9*, 3876, doi:10.3390/jcm9123876.
206. Liccardo, D.; Marzano, F.; Carraturo, F.; Guida, M.; Femminella, G.D.; Bencivenga, L.; Agrimi, J.; Addonizio, A.; Melino, I.; Valletta, A.; et al. Potential Bidirectional Relationship Between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 683, doi:10.3389/fphys.2020.00683.
207. Fang, W.-L.; Jiang, M.-J.; Gu, B.-B.; Wei, Y.-M.; Fan, S.-N.; Liao, W.; Zheng, Y.-Q.; Liao, S.-W.; Xiong, Y.; Li, Y.; et al. Tooth Loss as a Risk Factor for Dementia: Systematic Review and Meta-Analysis of 21 Observational Studies. *BMC Psychiatry* **2018**, *18*, 345, doi:10.1186/s12888-018-1927-0.
208. Olsen, I.; Singhrao, S.K. Can Oral Infection Be a Risk Factor for Alzheimer's Disease? *Journal of Oral Microbiology* **2015**, *7*, 29143, doi:10.3402/jom.v7.29143.
209. Lukiw, W.J. Bacteroides Fragilis Lipopolysaccharide and Inflammatory Signaling in Alzheimer's Disease. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01544.
210. Zhang, J.; Yu, C.; Zhang, X.; Chen, H.; Dong, J.; Lu, W.; Song, Z.; Zhou, W. Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide Induces Cognitive Dysfunction, Mediated by Neuronal Inflammation via Activation of the TLR4 Signaling Pathway in C57BL/6 Mice. *J Neuroinflammation* **2018**, *15*, 37, doi:10.1186/s12974-017-1052-x.
211. Poole, S.; Singhrao, S.K.; Chukkapalli, S.; Rivera, M.; Velsko, I.; Kesavalu, L.; Crean, S. Active Invasion of Porphyromonas Gingivalis and Infection-Induced Complement Activation in ApoE-/- Mice Brains. *JAD* **2014**, *43*, 67–80, doi:10.3233/JAD-140315.
212. Ilievski, V.; Zuchowska, P.K.; Green, S.J.; Toth, P.T.; Ragozzino, M.E.; Le, K.; Aljewari, H.W.; O'Brien-Simpson, N.M.; Reynolds, E.C.; Watanabe, K. Chronic Oral Application of a Periodontal Pathogen Results in Brain Inflammation, Neurodegeneration and Amyloid Beta Production in Wild Type Mice. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204941, doi:10.1371/journal.pone.0204941.
213. Wu, Z.; Ni, J.; Liu, Y.; Teeling, J.L.; Takayama, F.; Collcutt, A.; Ibbett, P.; Nakanishi, H. Cathepsin B Plays a Critical Role in Inducing Alzheimer's Disease-like Phenotypes Following Chronic Systemic Exposure to Lipopolysaccharide from Porphyromonas Gingivalis in Mice. *Brain, Behavior, and Immunity* **2017**, *65*, 350–361, doi:10.1016/j.bbi.2017.06.002.
214. Schwahn, C.; Frenzel, S.; Holtfreter, B.; Van der Auwera, S.; Pink, C.; Bülow, R.; Friedrich, N.; Völzke, H.; Biffar, R.; Kocher, T.; et al. Effect of Periodontal Treatment on Preclinical Alzheimer's Disease—Results of a Trial Emulation Approach. *Alzheimer's & Dementia* **2021**, alz.12378, doi:10.1002/alz.12378.
215. American Psychiatric Association *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*; Fifth Edition.; American Psychiatric Association, 2013; ISBN 978-0-89042-555-8.
216. Catalá-López, F.; Ridao, M.; Hurtado, I.; Núñez-Beltrán, A.; Gènova-Maleras, R.; Alonso-Arroyo, A.; Tobías, A.; Aleixandre-Benavent, R.; Catalá, M.A.; Tabarés-Seisdedos, R. Prevalence and Comorbidity of Autism Spectrum Disorder in Spain: Study Protocol for a Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Syst Rev* **2019**, *8*, 141, doi:10.1186/s13643-019-1061-1.
217. Gandhi, R.P.; Klein, U. Autism Spectrum Disorders: An Update on Oral Health Management. *J Evid Based Dent Pract* **2014**, *14 Suppl*, 115–126, doi:10.1016/j.jebdp.2014.03.002.
218. Lu, Y.-Y.; Wei, I.-H.; Huang, C.-C. Dental Health - a Challenging Problem for a Patient with Autism Spectrum Disorder. *Gen Hosp Psychiatry* **2013**, *35*, 214.e1–3, doi:10.1016/j.genhosppsych.2012.06.012.
219. Delli, K.; Reichart, P.A.; Bornstein, M.M.; Livas, C. Management of Children with Autism Spectrum Disorder in the Dental Setting: Concerns, Behavioural Approaches and Recommendations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2013**, *18*, e862-868, doi:10.4317/medoral.19084.
220. Qiao, Y.; Wu, M.; Feng, Y.; Zhou, Z.; Chen, L.; Chen, F. Alterations of Oral Microbiota Distinguish Children with Autism Spectrum Disorders from Healthy Controls. *Sci Rep* **2018**, *8*, 1597, doi:10.1038/s41598-018-19982-y.
221. Kong, X.; Liu, J.; Cetinbas, M.; Sadreyev, R.; Koh, M.; Huang, H.; Adeseye, A.; He, P.; Zhu, J.; Russell, H.; et al. New and Preliminary Evidence on Altered Oral and Gut Microbiota in Individuals with Autism Spectrum Disorder (ASD): Implications for ASD Diagnosis and Subtyping Based on Microbial Biomarkers. *Nutrients* **2019**, *11*, 2128, doi:10.3390/nu11092128.
222. Olsen, I.; Hicks, S.D. Oral Microbiota and Autism Spectrum Disorder (ASD). *Journal of Oral Microbiology* **2020**, *12*, 1702806, doi:10.1080/20002297.2019.1702806.
223. Aghbari, S.M.H.; Abushouk, A.I.; Attia, A.; Elmaraezy, A.; Menshawy, A.; Ahmed, M.S.; Elsaadany, B.A.; Ahmed, E.M. Malignant Transformation of Oral Lichen Planus and Oral Lichenoid Lesions: A Meta-Analysis of 20095 Patient Data. *Oral Oncology* **2017**, *68*, 92–102, doi:10.1016/j.oraloncology.2017.03.012.
224. Buffington, S.A.; Di Prisco, G.V.; Auchtung, T.A.; Ajami, N.J.; Petrosino, J.F.; Costa-Mattioli, M. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell* **2016**, *165*, 1762–1775, doi:10.1016/j.cell.2016.06.001.
225. Kumar, H.; Sharma, B. Minocycline Ameliorates Prenatal Valproic Acid Induced Autistic Behaviour, Biochemistry and Blood Brain Barrier Impairments in Rats. *Brain Research* **2016**, *1630*, 83–97, doi:10.1016/j.brainres.2015.10.052.

226. Wang, X.; Yang, J.; Zhang, H.; Yu, J.; Yao, Z. Oral Probiotic Administration during Pregnancy Prevents Autism-related Behaviors in Offspring Induced by Maternal Immune Activation via Anti-inflammation in Mice. *Autism Research* **2019**, *12*, 576–588, doi:10.1002/aur.2079.
227. Lin, D.; Yang, L.; Wen, L.; Lu, H.; Chen, Q.; Wang, Z. Crosstalk between the Oral Microbiota, Mucosal Immunity, and the Epithelial Barrier Regulates Oral Mucosal Disease Pathogenesis. *Mucosal Immunol* **2021**, doi:10.1038/s41385-021-00413-7.
228. Freire, M.; Nelson, K.E.; Edlund, A. The Oral Host–Microbial Interactome: An Ecological Chronometer of Health? *Trends in Microbiology* **2021**, *29*, 551–561, doi:10.1016/j.tim.2020.11.004.
229. Gupta, S.; Jawanda, M. Oral Lichen Planus: An Update on Etiology, Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis and Management. *Indian J Dermatol* **2015**, *60*, 222, doi:10.4103/0019-5154.156315.
230. Li, Y.; Wang, K.; Zhang, B.; Tu, Q.; Yao, Y.; Cui, B.; Ren, B.; He, J.; Shen, X.; Van Nostrand, J.D.; et al. Salivary Mycobiome Dysbiosis and Its Potential Impact on Bacteriome Shifts and Host Immunity in Oral Lichen Planus. *Int J Oral Sci* **2019**, *11*, 13, doi:10.1038/s41368-019-0045-2.
231. Scully, C.; Felix, D.H. Oral Medicine — Update for the Dental Practitioner Aphthous and Other Common Ulcers. *Br Dent J* **2005**, *199*, 259–264, doi:10.1038/sj.bdj.4812649.
232. Yang, Z.; Cui, Q.; An, R.; Wang, J.; Song, X.; Shen, Y.; Wang, M.; Xu, H. Comparison of Microbiomes in Ulcerative and Normal Mucosa of Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)-Affected Patients. *BMC Oral Health* **2020**, *20*, 128, doi:10.1186/s12903-020-01115-5.
233. Kim, Y.; Choi, Y.S.; Baek, K.J.; Yoon, S.-H.; Park, H.K.; Choi, Y. Mucosal and Salivary Microbiota Associated with Recurrent Aphthous Stomatitis. *BMC Microbiol* **2016**, *16*, 57, doi:10.1186/s12866-016-0673-z.
234. Yu, F.Y.; Wang, Q.Q.; Li, M.; Cheng, Y.-H.; Cheng, Y.-S.L.; Zhou, Y.; Yang, X.; Zhang, F.; Ge, X.; Zhao, B.; et al. Dysbiosis of Saliva Microbiome in Patients with Oral Lichen Planus. *BMC Microbiol* **2020**, *20*, 75, doi:10.1186/s12866-020-01733-7.
235. Johnson, N.W.; Jayasekara, P.; Amarasinghe, A.A.H.K. Squamous Cell Carcinoma and Precursor Lesions of the Oral Cavity: Epidemiology and Aetiology: Oral Cancer Epidemiology/Aetiology. *Periodontology 2000* **2011**, *57*, 19–37, doi:10.1111/j.1600-0757.2011.00401.x.
236. Schwabe, R.F.; Jobin, C. The Microbiome and Cancer. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13*, 800–812, doi:10.1038/nrc3610.
237. Lim, Y.; Fukuma, N.; Totsika, M.; Kenny, L.; Morrison, M.; Punyadeera, C. The Performance of an Oral Microbiome Biomarker Panel in Predicting Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 267, doi:10.3389/fcimb.2018.00267.
238. Yang, S.-F.; Huang, H.-D.; Fan, W.-L.; Jong, Y.-J.; Chen, M.-K.; Huang, C.-N.; Chuang, C.-Y.; Kuo, Y.-L.; Chung, W.-H.; Su, S.-C. Compositional and Functional Variations of Oral Microbiota Associated with the Mutational Changes in Oral Cancer. *Oral Oncology* **2018**, *77*, 1–8, doi:10.1016/j.oraloncology.2017.12.005.
239. Yang, C.-Y.; Yeh, Y.-M.; Yu, H.-Y.; Chin, C.-Y.; Hsu, C.-W.; Liu, H.; Huang, P.-J.; Hu, S.-N.; Liao, C.-T.; Chang, K.-P.; et al. Oral Microbiota Community Dynamics Associated With Oral Squamous Cell Carcinoma Staging. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 862, doi:10.3389/fmicb.2018.00862.
240. Amer, A.; Galvin, S.; Healy, C.M.; Moran, G.P. The Microbiome of Potentially Malignant Oral Leukoplakia Exhibits Enrichment for Fusobacterium, Leptotrichia, Campylobacter, and Rothia Species. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2391, doi:10.3389/fmicb.2017.02391.
241. Hashimoto, K.; Shimizu, D.; Hirabayashi, S.; Ueda, S.; Miyabe, S.; Oh-iwa, I.; Nagao, T.; Shimozato, K.; Nomoto, S. Changes in Oral Microbial Profiles Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma vs Leukoplakia. *J Invest Clin Dent* **2019**, *10*, doi:10.1111/jicd.12445.
242. Monsarrat, P.; Blaizot, A.; Kémoun, P.; Ravaud, P.; Nabet, C.; Sixou, M.; Vergnes, J.-N. Clinical Research Activity in Periodontal Medicine: A Systematic Mapping of Trial Registers. *J Clin Periodontol* **2016**, *43*, 390–400, doi:10.1111/jcpe.12534.
243. Zalewska, A.; Waszkiewicz, N.; López-Pintor, R.M. The Use of Saliva in the Diagnosis of Oral and Systemic Diseases. *Dis Markers* **2019**, *2019*, 9149503, doi:10.1155/2019/9149503.
244. Huang, N.; Pérez, P.; Kato, T.; Mikami, Y.; Okuda, K.; Gilmore, R.C.; Conde, C.D.; Gasmi, B.; Stein, S.; Beach, M.; et al. SARS-CoV-2 Infection of the Oral Cavity and Saliva. *Nat Med* **2021**, *27*, 892–903, doi:10.1038/s41591-021-01296-8.
245. Kapoor, P.; Chowdhry, A.; Kharbanda, O.P.; Bablani Popli, D.; Gautam, K.; Saini, V. Exploring Salivary Diagnostics in COVID-19: A Scoping Review and Research Suggestions. *BDJ Open* **2021**, *7*, 8, doi:10.1038/s41405-021-00064-7.
246. Javaid, M.A.; Ahmed, A.S.; Durand, R.; Tran, S.D. Saliva as a Diagnostic Tool for Oral and Systemic Diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **2016**, *6*, 67–76, doi:10.1016/j.jobcr.2015.08.006.
247. Wei, F.; Lin, C.-C.; Joon, A.; Feng, Z.; Troche, G.; Lira, M.E.; Chia, D.; Mao, M.; Ho, C.-L.; Su, W.-C.; et al. Noninvasive Saliva-Based *EGFR* Gene Mutation Detection in Patients with Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* **2014**, *190*, 1117–1126, doi:10.1164/rccm.201406-1003OC.
248. Pu, D.; Liang, H.; Wei, F.; Akin, D.; Feng, Z.; Yan, Q.; Li, Y.; Zhen, Y.; Xu, L.; Dong, G.; et al. Evaluation of a Novel Saliva-based Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Detection for Lung Cancer: A Pilot Study. *Thoracic Cancer* **2016**, *7*, 428–436, doi:10.1111/1759-7714.12350.
249. Kaczor-Urbanowicz, K.E.; Wei, F.; Rao, S.L.; Kim, J.; Shin, H.; Cheng, J.; Tu, M.; Wong, D.T.W.; Kim, Y. Clinical Validity of Saliva and Novel Technology for Cancer Detection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2019**, *1872*, 49–59, doi:10.1016/j.bbcan.2019.05.007.

250. Zhang, C.-Z.; Cheng, X.-Q.; Li, J.-Y.; Zhang, P.; Yi, P.; Xu, X.; Zhou, X.-D. Saliva in the Diagnosis of Diseases. *Int J Oral Sci* **2016**, *8*, 133–137, doi:10.1038/ijos.2016.38.
251. Mannoor, M.S.; Tao, H.; Clayton, J.D.; Sengupta, A.; Kaplan, D.L.; Naik, R.R.; Verma, N.; Omenetto, F.G.; McAlpine, M.C. Graphene-Based Wireless Bacteria Detection on Tooth Enamel. *Nat Commun* **2012**, *3*, 763, doi:10.1038/ncomms1767.
252. Wong, D.T. Towards a Simple, Saliva-Based Test for the Detection of Oral Cancer "Oral Fluid (Saliva), Which Is the Mirror of the Body, Is a Perfect Medium to Be Explored for Health and Disease Surveillance." *Expert Rev Mol Diagn* **2006**, *6*, 267–272, doi:10.1586/14737159.6.3.267.
253. Jiang, S.; Zeng, J.; Zhou, X.; Li, Y. Drug Resistance and Gene Transfer Mechanisms in Respiratory/Oral Bacteria. *J Dent Res* **2018**, *97*, 1092–1099, doi:10.1177/0022034518782659.
254. Belibasakis, G.N.; Bostanci, N.; Marsh, P.D.; Zaura, E. Applications of the Oral Microbiome in Personalized Dentistry. *Archives of Oral Biology* **2019**, *104*, 7–12, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.05.023.
255. Jepsen, K.; Jepsen, S. Antibiotics/Antimicrobials: Systemic and Local Administration in the Therapy of Mild to Moderately Advanced Periodontitis. *Periodontol 2000* **2016**, *71*, 82–112, doi:10.1111/prd.12121.
256. Cieplik, F.; Jakubovics, N.S.; Buchalla, W.; Maisch, T.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria – Is There Cause for Concern? *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 587, doi:10.3389/fmicb.2019.00587.
257. Carra, M.C.; Detzen, L.; Kitzmann, J.; Woelber, J.P.; Ramseier, C.A.; Bouchard, P. Promoting Behavioural Changes to Improve Oral Hygiene in Patients with Periodontal Diseases: A Systematic Review. *J Clin Periodontol* **2020**, *47*, 72–89, doi:10.1111/jcpe.13234.
258. Chapple, I.L.C.; Van der Weijden, F.; Doerfer, C.; Herrera, D.; Shapira, L.; Polak, D.; Madianos, P.; Louropoulou, A.; Machtei, E.; Donos, N.; et al. Primary Prevention of Periodontitis: Managing Gingivitis. *J Clin Periodontol* **2015**, *42*, S71–S76, doi:10.1111/jcpe.12366.
259. Isacco, C.G.; Ballini, A.; De Vito, D.; Nguyen, K.C.D.; Cantore, S.; Bottalico, L.; Quagliuolo, L.; Boccellino, M.; Di Domenico, M.; Santacroce, L.; et al. Rebalancing the Oral Microbiota as an Efficient Tool in Endocrine, Metabolic and Immune Disorders. *EMIDDT* **2021**, *21*, 777–784, doi:10.2174/1871530320666200729142504.
260. Rosier, B.T.; Marsh, P.D.; Mira, A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J Dent Res* **2018**, *97*, 371–380, doi:10.1177/0022034517742139.
261. Fang, D.; Shi, D.; Lv, L.; Gu, S.; Wu, W.; Chen, Y.; Guo, J.; Li, A.; Hu, X.; Guo, F.; et al. Bifidobacterium Pseudocatenulatum LI09 and Bifidobacterium Catenulatum LI10 Attenuate D-Galactosamine-Induced Liver Injury by Modifying the Gut Microbiota. *Sci Rep* **2017**, *7*, 8770, doi:10.1038/s41598-017-09395-8.
262. Schneeberger, M.; Everard, A.; Gómez-Valadés, A.G.; Matamoros, S.; Ramírez, S.; Delzenne, N.M.; Gomis, R.; Claret, M.; Cani, P.D. Akkermansia Muciniphila Inversely Correlates with the Onset of Inflammation, Altered Adipose Tissue Metabolism and Metabolic Disorders during Obesity in Mice. *Sci Rep* **2015**, *5*, 16643, doi:10.1038/srep16643.
263. Moya-Pérez, A.; Neef, A.; Sanz, Y. Bifidobacterium Pseudocatenulatum CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126976, doi:10.1371/journal.pone.0126976.
264. Teughels, W.; Newman, M.G.; Coucke, W.; Haffajee, A.D.; Van Der Mei, H.C.; Haake, S.K.; Schepers, E.; Cassiman, J.-J.; Van Eldere, J.; van Steenberghe, D.; et al. Guiding Periodontal Pocket Recolonization: A Proof of Concept. *J Dent Res* **2007**, *86*, 1078–1082, doi:10.1177/154405910708601111.
265. Rosier, B.T.; Moya-Gonzalvez, E.M.; Corell-Escuin, P.; Mira, A. Isolation and Characterization of Nitrate-Reducing Bacteria as Potential Probiotics for Oral and Systemic Health. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 555465, doi:10.3389/fmicb.2020.555465.
266. Golub, L.M.; Lee, H. Periodontal Therapeutics: Current Host-modulation Agents and Future Directions. *Periodontol 2000* **2020**, *82*, 186–204, doi:10.1111/prd.12315.
267. Preshaw, P.M. Host Modulation Therapy with Anti-Inflammatory Agents. *Periodontol 2000* **2018**, *76*, 131–149, doi:10.1111/prd.12148.
268. Tonetti, M.S.; Chapple, I.L.C.; on Behalf of Working Group 3 of the Seventh European Workshop on Periodontology Biological Approaches to the Development of Novel Periodontal Therapies - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology: Development of Novel Periodontal Therapies. *Journal of Clinical Periodontology* **2011**, *38*, 114–118, doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01675.x.
269. Gorr, S.-U.; Abdolhosseini, M. Antimicrobial Peptides and Periodontal Disease: Antimicrobial Peptides. *Journal of Clinical Periodontology* **2011**, *38*, 126–141, doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01664.x.
270. Jourdain, M.; Velard, F.; Pierrard, L.; Sergheraert, J.; Gangloff, S.C.; Braux, J. Cationic Antimicrobial Peptides and Periodontal Physiopathology: A Systematic Review. *J Periodont Res* **2019**, *54*, 589–600, doi:10.1111/jre.12676.
271. Batool, F.; Stutz, C.; Petit, C.; Benkirane-Jessel, N.; Delpy, E.; Zal, F.; Leize-Zal, E.; Huck, O. A Therapeutic Oxygen Carrier Isolated from Arenicola Marina Decreased P. Gingivalis Induced Inflammation and Tissue Destruction. *Sci Rep* **2020**, *10*, 14745, doi:10.1038/s41598-020-71593-8.
272. Martinon, P.; Fraticelli, L.; Giboreau, A.; Dussart, C.; Bourgeois, D.; Carrouel, F. Nutrition as a Key Modifiable Factor for Periodontitis and Main Chronic Diseases. *JCM* **2021**, *10*, 197, doi:10.3390/jcm10020197.
273. Balta, M.G.; Loos, B.G.; Nicu, E.A. Emerging Concepts in the Resolution of Periodontal Inflammation: A Role for Resolvin E1. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1682, doi:10.3389/fimmu.2017.01682.

274. Sulijaya, B.; Takahashi, N.; Yamazaki, K. Host Modulation Therapy Using Anti-Inflammatory and Antioxidant Agents in Periodontitis: A Review to a Clinical Translation. *Archives of Oral Biology* **2019**, *105*, 72–80, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.07.002.
275. Lee, C.J.; Iyer, G.; Liu, Y.; Kalyani, R.R.; Bamba, N.; Ligon, C.B.; Varma, S.; Mathioudakis, N. The Effect of Vitamin D Supplementation on Glucose Metabolism in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Intervention Studies. *J Diabetes Complications* **2017**, *31*, 1115–1126, doi:10.1016/j.jdiacomp.2017.04.019.
276. Sacerdote, A.; Dave, P.; Lokshin, V.; Bahtiyar, G. Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, and Vitamin D. *Curr Diab Rep* **2019**, *19*, 101, doi:10.1007/s11892-019-1201-y.
277. Issa, C.M. Vitamin D and Type 2 Diabetes Mellitus. *Adv Exp Med Biol* **2017**, *996*, 193–205, doi:10.1007/978-3-319-56017-5_16.
278. Lips, P.; Eekhoff, M.; van Schoor, N.; Oosterwerff, M.; de Jongh, R.; Krul-Poel, Y.; Simsek, S. Vitamin D and Type 2 Diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2017**, *173*, 280–285, doi:10.1016/j.jsbmb.2016.11.021.
279. Antonoglou, G.N.; Knuuttila, M.; Niemelä, O.; Raunio, T.; Karttunen, R.; Vainio, O.; Hedberg, P.; Ylöstalo, P.; Tervonen, T. Low Serum Level of 1,25(OH)2 D Is Associated with Chronic Periodontitis. *J Periodontal Res* **2015**, *50*, 274–280, doi:10.1111/jre.12207.
280. Rhodes, J.M.; Subramanian, S.; Laird, E.; Griffin, G.; Kenny, R.A. Perspective: Vitamin D Deficiency and COVID-19 Severity - Plausibly Linked by Latitude, Ethnicity, Impacts on Cytokines, ACE2 and Thrombosis. *J Intern Med* **2021**, *289*, 97–115, doi:10.1111/joim.13149.
281. Mangin, M.; Sinha, R.; Fincher, K. Inflammation and Vitamin D: The Infection Connection. *Inflamm Res* **2014**, *63*, 803–819, doi:10.1007/s00011-014-0755-z.
282. Pilz, S.; Kienreich, K.; Rutters, F.; de Jongh, R.; van Ballegooijen, A.J.; Grübler, M.; Tomaschitz, A.; Dekker, J.M. Role of Vitamin D in the Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* **2013**, *13*, 261–270, doi:10.1007/s11892-012-0358-4.
283. Patel, M. Dental Caries Vaccine: Are We There Yet? *Lett Appl Microbiol* **2020**, *70*, 2–12, doi:10.1111/lam.13218.
284. Malla, M.A.; Dubey, A.; Kumar, A.; Yadav, S.; Hashem, A.; Abd_Allah, E.F. Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment. *Front. Immunol.* **2019**, *9*, 2868, doi:10.3389/fimmu.2018.02868.
285. Myneni, S.R.; Brocavich, K.; Wang, H. Biological Strategies for the Prevention of Periodontal Disease: Probiotics and Vaccines. *Periodontol 2000* **2020**, *84*, 161–175, doi:10.1111/prd.12343.
286. Falcao, A.; Bullón, P. A Review of the Influence of Periodontal Treatment in Systemic Diseases. *Periodontol 2000* **2019**, *79*, 117–128, doi:10.1111/prd.12249.
287. Jeffcoat, M.K.; Jeffcoat, R.L.; Gladowski, P.A.; Bramson, J.B.; Blum, J.J. Impact of Periodontal Therapy on General Health. *American Journal of Preventive Medicine* **2014**, *47*, 166–174, doi:10.1016/j.amepre.2014.04.001.
288. GBD 2017 Oral Disorders Collaborators; Bernabe, E.; Marcenes, W.; Hernandez, C.R.; Bailey, J.; Abreu, L.G.; Alipour, V.; Amini, S.; Arabloo, J.; Arefi, Z.; et al. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J Dent Res* **2020**, *99*, 362–373, doi:10.1177/0022034520908533.
289. Vos, T.; Abajobir, A.A.; Abate, K.H.; Abbafati, C.; Abbas, K.M.; Abd-Allah, F.; Abdulkader, R.S.; Abdulle, A.M.; Abebo, T.A.; Abera, S.F.; et al. Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 328 Diseases and Injuries for 195 Countries, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet* **2017**, *390*, 1211–1259, doi:10.1016/S0140-6736(17)32154-2.