

A. ACTINOMYCETEMCOMITANS, CLONE JP2 : ÉPIDÉMIOLOGIE ET RÔLE DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA PARODONTITE

Mémoire de Diplôme Universitaire de Parodontie Clinique, Université Paris 5

Docteur Olivier Samtmann

Soutenu publiquement le 27 novembre 2012

Résumé

Une bactérie, une maladie. Cette hypothèse, aujourd'hui dévoyée en parodontologie n'est peut-être pas tant éloignée de la réalité lorsque l'on s'intéresse au clone JP2 d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. En effet, comment et pourquoi l'acquisition de ce clone hautement leucotoxique peut-elle engendrer, quasiment à coup sûr, une maladie parodontale destructrice chez un hôte spécifique sans toutefois affirmer qu'il est le seul responsable?

L'origine ethnique de l'individu semble être un critère essentiel à l'infection par JP2, cependant cela ne paraît pas suffisant. L'existence d'une fenêtre temporelle de contamination dans l'enfance, associée à des habitudes comportementales considérées à risque permettent d'identifier la population cible.

Pourrait-on développer un moyen de détection de routine préventif de ce clone, utilisable au cours d'une période sensible chez une population spécifique, sachant que celui-ci est peu, voire qu'il n'est pas retrouvé chez l'adulte?

Mots clés

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, JP2, parodontite agressive

Conflit d'intérêt et subvention

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêt. Aucune subvention n'a été reçue pour cet publication.

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction	4
2. Généralités sur <i>A. actinomycetemcomitans</i>	5
2.1. Historique	5
2.2. Caractéristiques	5
2.2.1. Classification	5
2.2.2. Facteurs de virulence d' <i>A. actinomycetemcomitans</i>	5
3. Pathogène spécifique : le clone JP2	8
3.1. Origines	8
3.2. Association avec la parodontite agressive	8
3.3. Association avec un hôte spécifique	16
3.4. Modes de transmission	18
4. Conclusion	21
Références bibliographiques.....	22

1. INTRODUCTION

La parodontite est une maladie inflammatoire d'origine infectieuse qui se caractérise par la perte d'ancrage de la dent.

Son étiologie bactérienne fût le lit de nombreuses divergences quant à son processus de développement. En effet, il a été supposé que la parodontite ne pouvait être causée que par quelques, voire une seule et unique bactérie, à la façon d'un pathogène exogène. Le but du traitement était donc d'éradiquer ces bactéries par des antimicrobiens afin de traiter la maladie et/ou de la prévenir [54]. Nombre d'auteurs, tels Theilade ou Marsh, s'opposaient à cette vision en démontrant simplement que ces bactéries pouvaient être retrouvées chez des patients au parodonte sain [44], [52]. Pour eux, ces organismes devaient être considérés comme commensaux avec un potentiel pathogénique opportuniste. Les maladies parodontales devenaient le résultat d'un déséquilibre entre un écosystème bactérien à l'organisation complexe et la réponse d'un hôte aux caractéristiques intrinsèques et environnementales uniques.

Toutefois, il ne paraît plus nécessaire d'opposer ces deux visions ancestrales de la parodontite. Les études sur les maladies parodontales agressives, associées à la contamination par une espèce bactérienne ayant suscité beaucoup d'intérêt, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, font supposer que les deux modes de fonctionnement peuvent exister.

Ce mémoire propose d'étayer cette thèse en proposant une rétrospective des études, forcément non exhaustive, impliquant ce microbiote dans la parodontite agressive et plus particulièrement l'un de ses clones hautement parodontopathogène.

2. GÉNÉRALITÉS SUR A. *ACTINOMYCETEMCOMITANS*

2.1. HISTORIQUE

Initialement, *A. actinomycetemcomitans* fût retrouvé dans les lésions d'actinomycose. À présent, il est considéré comme l'une des bactéries les plus impliquées dans la pathogenèse des maladies parodontales.

Son habitat naturel est la cavité buccale. Mais il peut être retrouvé dans plusieurs infections non orales : endocardites, bactériémies, septicémies, arthrite infectieuse, infections urinaires, infections cutanées, abcès... [54]. Les *A. actinomycetemcomitans* non oraux présentent de fortes similarités avec l'*A. actinomycetemcomitans* buccal, ce qui laisse supposer une dissémination à partir de la bouche [16] [17].

2.2. CARACTÉRISTIQUES

2.2.1. CLASSIFICATION

A. actinomycetemcomitans est une bactérie à Gram négatif, capnophile et anaérobie facultative. Le séquençage de son génome montre qu'elle est étroitement liée à la famille des *Pasteurellaceae* (*Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella*...).

La détermination du sérotype consiste à mettre en évidence, par des techniques de laboratoire, des antigènes différents sur un même micro-organisme à des fins de classification. Concernant *A. actinomycetemcomitans*, son antigène immunodominant est un O-polysaccharide de haut poids moléculaire issu du lipopolysaccharide (LPS) qui permet de distinguer 7 sérotypes différents (a à g) [48][51]. Pour autant, certains *A. actinomycetemcomitans* restent non sérotypables.

Ces six sérotypes ont une distribution variable en fonction des différentes régions du globe. En effet, les populations asiatiques sont essentiellement colonisées par le sérotype c et plus occasionnellement par le sérotype b. Ce dernier est retrouvé préférentiellement chez les Caucasiens. Les sérotypes d, e et f se font quant à eux beaucoup plus rares à travers le monde.

Ces variations suggèrent que certains types d'*A. actinomycetemcomitans* peuvent coloniser préférentiellement des hôtes en fonction de leur ethnie. Au contraire, on peut aussi supposer qu'il n'y a pas de spécificité de l'hôte mais des modes de dissémination différents, associés à des mutations génétiques sur un clone ancestral commun. On rappellera que d'après Maynard Smith, un clone bactérien est un jeu de cellules au profils génétiques similaires, récemment dérivées d'un ancêtre commun mais sans recombinaisons chromosomiques [29][45].

2.2.2. FACTEURS DE VIRULENCE D'*A. ACTINOMYCETEMCOMITANS*

Le comportement virulent de cette bactérie provient notamment de l'action de toxines spécifiques qui peuvent contribuer à la perte des tissus de soutien de la dent et induire des effets délétères sur le système immunitaire. Ces toxines sont, entre autres, la leucotoxine d'*A. actinomycetemcomitans* (LTX) et une version de la cytolethal distending toxin (CDT) [54].

2.2.2.1. LEUCOTOXINE D'*A. ACTINOMYCETEMCOMITANS*

Cette toxine interfère avec les défenses de l'hôte par des interactions toxines/récepteurs complexes. Son effet principal est dirigé contre les leucocytes, en particulier les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) [4][35][36]. Elle peut induire la nécrose ou l'apoptose des cellules cibles.

Lorsqu'elle est sécrétée, on la retrouve soit attachée à la surface cellulaire, soit à l'intérieur de vésicules, elles-mêmes liées à la surface bactérienne [38]. *In vitro*, les souches d'*A. actinomycetemcomitans* caractérisées par des contours lisses, non adhérents, ont la capacité de sécréter beaucoup plus de leucotoxines dans les phases précoces de leur croissance. Par ailleurs, l'utilisation d'un sérum similaire au fluide gingival permettrait de décrocher ces leucotoxines de la surface cellulaire. Cette donnée suggère un comportement similaire au sein du sillon gingivo-dentaire lorsque l'exsudat sulculaire est augmenté en période inflammatoire. Le mécanisme complet de la sécrétion de la toxine reste à ce jour non élucidé.

D'autre part, seules certaines souches d'*A. actinomycetemcomitans* présentent une activité hémolytique importante (colonies β-hémolytiques). Cette activité est corrélée avec une forte production de leucotoxines (comme nous le présenterons par la suite, les clones JP2 forment ces colonies). Les propriétés leucotoxiques ne sont donc pas les mêmes pour toutes des souches d'*A. actinomycetemcomitans* [5][50], aboutissant à la qualification de souches « hautement leucotoxiques » et « faiblement leucotoxiques ».

Néanmoins, malgré cette variabilité, toutes les souches d'*A. actinomycetemcomitans* sont retrouvées avec l'opéron *ltx* au complet dans leur génome. Celui-ci consiste en un groupement de quatre gènes impliqués dans la sécrétion de la leucotoxine (figure 1).



Figure 1 - Organisation des quatre gènes de l'opéron *ltx* [32].

Cette variation ne pouvant être due à une mutation de ces quatre gènes, d'autres recherches ont permis de découvrir une délétion de 530 paires de bases (pb) dans la région du promoteur en amont de l'opéron [7] entraînant une production de leucotoxine multipliée par dix à vingt. Des différences continuent d'être observées en raison de l'hétérogénéité génétique de l'opéron.

La régulation chez les souches faiblement et hautement leucotoxiques serait donc différente. Pour les moins virulents, l'expression de la leucotoxine serait régulée par un promoteur de 150 pb, appartenant à la région des 530 pb perdues par les clones JP2 (figure 2). Il est donc suggéré que d'autres promoteurs de régulation (deux sont supposés [7]) prendraient le relais chez ces clones. En effet, des prélèvements sur une femme Japonaise atteinte de parodontite agressive ont permis d'isoler deux souches d'*A. actinomycetemcomitans* hautement leucotoxiques, mais sans la délétion de 530 pb [33]. Par contre, on retrouve l'insertion d'une nouvelle séquence de paires de bases dans la région du promoteur.

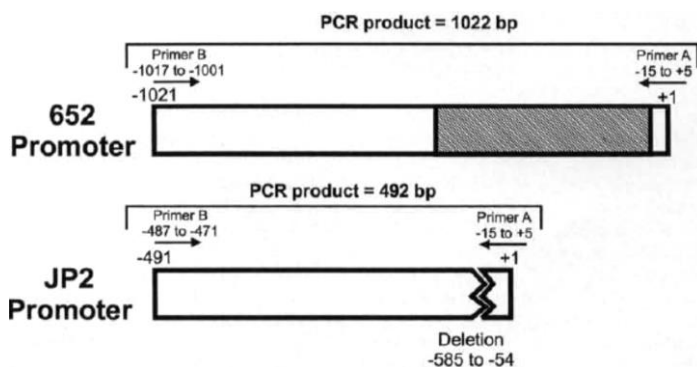


Figure 2 - Promoteurs de l'opéron *ltx*. Au-dessus sans la délétion, en-dessous avec la délétion (clone JP2) [13].

Les souches faiblement leucotoxiques encoderaient un transcrite plus court (*rtxC* + *rtxA*) que les souches hautement leucotoxiques pour lesquelles l'intégralité de l'opéron est encodé (*rtxCABD*) (figure 3).

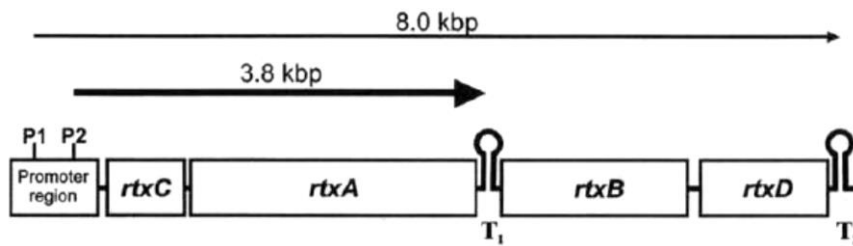


Figure 3 - Transcrit court : 3,8 kpb, transcrit intégral : 8 kpb [13].

Ceci montre qu'il existe un polymorphisme génétique des souches d'*A. actinomycetemcomitans*, influençant la fonction de l'opéron ltx. Néanmoins, on ne peut exclure la possibilité qu'il existe ce même type de polymorphisme au sein même de l'opéron, ou d'autres mécanismes de régulation encore inconnus à ce jour. Les facteurs environnementaux, tels que la tension en oxygène, la disponibilité en sucre ou en fer, peuvent affecter la production de la leucotoxine.

Les individus porteurs de souches d'*A. actinomycetemcomitans* producteurs de leucotoxines présentent de fortes doses d'anticorps anti-*A. actinomycetemcomitans* et spécialement anti-leucotoxine [12][55]. Afin de pouvoir survivre dans cet environnement hostile, cette toxine doit affecter d'autres pans du système immunitaire.

Elle peut induire l'apoptose des cellules de défense, tels que les PMNs, lymphocytes, monocytes et autres macrophages [39]. L'élimination de PMNs entraîne le relargage par dégranulation d'enzymes lysosomales protéolytiques. Ces mêmes enzymes sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et donc du parodonte. De plus, la mort de cellules inflammatoires entraîne l'activation de caspases (caspase 1 : clivage de la forme inactive de l'IL-1 β en une cytokine pro-inflammatoire active) et le relargage rapide de cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α).

Cette leucotoxine, par son action sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, est également impliquée dans l'initiation de la perte osseuse par régulation du système RANK/RANKL/OPG et dans la différenciation des ostéoclastes.

2.2.2.2. CYTOLETHAL DISTENDING TOXIN (CDT)

Cette toxine, dont on parle beaucoup moins car présente en plus faibles concentrations, est elle aussi impliquée dans la modulation de la réponse inflammatoire. Elle possède la capacité d'induire la distension et la mort cellulaire programmée des cellules de l'inflammation. En effet, la CDT interrompt la division cellulaire au stade G2 (après la réplication de l'ADN). Les cellules avec un ADN aberrant sont bloquées et ne peuvent pas entrer en phase de mitose. Ces cellules entrent alors en phase d'apoptose [34]. Le mécanisme de blocage n'est pas encore déterminé, néanmoins il est supposé qu'une activité désoxyribonucléase de la CDT entraîne des dommages irréversibles au niveau de l'ADN.

Une autre hypothèse suggère que la CDT pourrait stimuler l'expression de RANKL au niveau des fibroblastes gingivaux, des cellules du desmodonte ou encore des cellules de la lignée des lymphocytes T, favorisant l'activation de la lignée ostéoclastique [34].

En conclusion, la CDT contribue au phénotype immunosuppresseur de l'*A. actinomycetemcomitans* et ses effets agissent en addition ou en synergie avec ceux de la leucotoxine.

Dans des proportions moindres, d'autres facteurs entrent en compte dans la modulation de la réponse inflammatoire. Il s'agit notamment de bactériocines, des inhibiteurs du chimiotactisme, des protéines fixatrices de fragment Fc, du LPS ou encore de collagénases, adhésines et autres invasines [42][43].

3. PATHOGENE SPECIFIQUE : LE CLONE JP2

Le clone JP2 de l’A. *actinomycetemcomitans* est une bactérie au potentiel parodontopathogène très important. Elle appartient à la sous-classe des sérotypes b et se caractérise génétiquement par la perte d’une séquence de 530 paires de bases au niveau de la région du promoteur de la leucotoxine.

Ce clone bactérien fût isolé pour la première fois en 1984 chez un enfant Afro-Américain de 8 ans atteint de parodontite pré-pubertaire [53]. Très vite il a été supposé que la présence de ce clone pouvait être corrélée avec la présence d’une parodontite agressive. De la même façon, l’hypothèse d’un tropisme ethnique de cette bactérie fût rapidement avancée. De nombreuses études sur le sujet ont tenté d’évaluer ces corrélations ainsi que les mécanismes de transmission et de pathogénicité de ce clone.

3.1. ORIGINES

Il existe une grande diversité génétique parmi les A. *actinomycetemcomitans* non JP2, tandis que celle-ci est infiniment plus faible pour les clones JP2 (*figure 4*). Il est également possible de distinguer certains clones les uns des autres (JP2 ou non JP2) en fonction des différentes régions du globe. Celui portée par les individus d’Afrique du Nord (Méditerranée) est différenciable de celui porté par les individus d’Afrique de l’Est (Cap Vert). En revanche, on ne peut pas différencier les clones provenant du Brésil ou des USA avec ceux d’Afrique de l’Ouest [29]. Cette répartition géographique, laisse suggérer une dissémination du clone JP2 lors de l’esclavage et de la traite de Noirs du 16^e au 18^e siècle. Les régressions permettent d’évaluer l’apparition de la mutation vers 2400 ans avant notre ère.

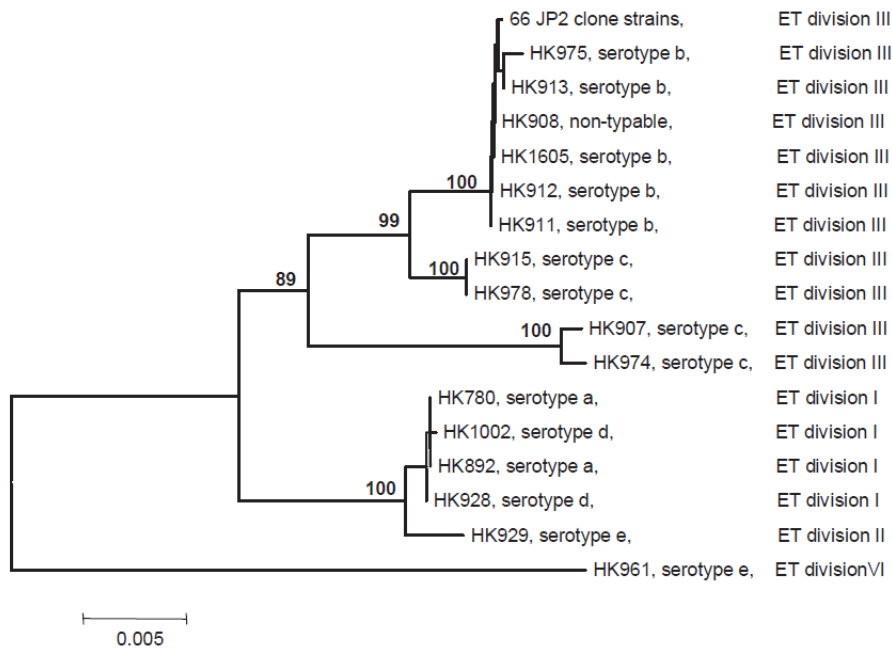


Figure 4 - Exemple de diversité clonale d’A. *actinomycetemcomitans* [32].

3.2. ASSOCIATION AVEC LA PARODONTITE AGRESSIVE

Une grande partie des observations sur le lien entre parodontite agressive et clone JP2 ont été menées par Dorte Haubek durant les quinze dernières années. L’essentiel de ses études ne concerne que des enfants Nord-Africains atteints de formes précoces de parodontite agressive parmi lesquels elle recherche un lien avec ce clone spécifique. Cette section résumera une partie de ses conclusions.

Avant 2001, dans un premier échantillon de 301 jeunes patients Marocains de 14 à 19 ans (moy. : 16,1 ans), elle observe la présence ou non, ainsi que la répartition des différents sérotypes d'*A. actinomycetemcomitans* (a ; b [JP2 et non JP2] ; c ; d ; e et f) en fonction de la présence ou non de pathologie parodontale précoce (Early Onset Periodontitis [EOP], à savoir : parodontite juvénile localisée [LJP], parodontite agressive généralisée [GJP], et perte d'attache localisée [IAL]), c'est-à-dire avec une perte d'attache ≥ 3 mm sur une ou plusieurs dents (*figure 5*) [22].

Cette étude, réalisée sur une population bien ciblée, fait écho à de précédents résultats où l'on supposait certains ribotypes d'*A. actinomycetemcomitans* fortement impliqués dans la pathogenèse de l'EOP, car plus fréquemment associés aux individus des familles enclines à la maladie parodontale [9].

Microbiological Findings	N	Healthy	Early-onset Periodontitis			
			LJP	GJP	IAL	All ^a
Plaque samples, total	301	256 (85.0) ^b	10 (3.3)	13 (4.3)	22 (7.3)	45 (15.0)
Plaque samples excluded	84	78 (92.9)	4 (4.8)	1 (1.2)	1 (1.2)	6 (7.1)
Plaque samples examined	217	178 (82.0)	6 (2.8)	12 (5.5)	21 (9.7)	39 (18.0)
No <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	86	76 (88.4)	1 (1.2)	0	9 (10.5)	10 (11.6)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> without 530-bp deletion	112	98 (87.5)	3 (2.7)	3 (2.7)	8 (7.1)	14 (12.5)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> with 530-bp deletion	15	4 (26.7)	2 (13.3)	7 (46.7)	2 (13.3)	11 (73.3)
Both promoter types of <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	4	0	0	2 (50.0)	2 (50.0)	4 (100)

Figure 5 - Distribution entre diagnostic et détection de l'*A. actinomycetemcomitans* [22].

Légendes : ^a = LJP, GLP et IAL ensemble - ^b = pourcentages entre parenthèses.

Parmi les patients porteurs de l'*A. actinomycetemcomitans* non JP2 (c'est-à-dire sans la délétion de 530 pb, tous sérotypes confondus), 12,5 % sont atteints d'EOP (soit 87,5 % sains) tandis que les porteurs du clone JP2 seul sont atteints à hauteur de 73,3 % (15 patients). Tous les porteurs des deux types d'*A. actinomycetemcomitans* (JP2 et non JP2) sont atteints d'EOP, mais cette configuration est assez rare puisqu'elle ne concerne que 4 patients (*figure 6*) [22].

	N	Serotype	Healthy	EOP
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> with the 530-bp deletion	19	b	4 (21.1) ^a	15 (78.9)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> without the 530-bp deletion	79	a	65 (82.2)	14 (17.7)
	12	b	12 (100)	0
	7	c	5 (71.4)	2 (28.6)
	13	d	12 (92.3)	1 (7.7)
	0	e	0	0
	5	nt ^b	4 (80.0)	1 (20.0)

Figure 6 - Répartition des différents sérotypes d'*A. actinomycetemcomitans* et statut parodontal [22].

Légendes : ^a = pourcentages entre parenthèses - ^b = non typable.

Si l'on se concentre sur le sérotype b, 78,9 % des porteurs du clone JP2 souffrent d'EOP, alors que tous les porteurs de non JP2 sont sains. Par extension, on remarque que des patients sains sont porteurs du clone JP2 malgré la forte association entre présence du clone et maladie parodontale. On peut dès à présent émettre l'hypothèse que la présence du clone JP2 peut être un marqueur valide du développement d'une parodontite agressive. De même, on peut se demander si les patients sains, positifs à JP2 au moment de l'observation, ne développeront pas de pathologies par la suite.

Par ailleurs, il ne faut pas oublier que « non détectable » ne signifie pas nécessairement « non présent ». En effet, les concentrations en bactéries peuvent être sous le seuil de détection de la méthode d'analyse employée, même pour la PCR. Cette remarque s'avèrera également valide pour les prochaines études exposées.

Cette étude ne détermine pas le sérotype b dans sa globalité comme spécialement pathogénique, car on ne retrouve pas d'individus malades chez les porteurs de non JP2. Toutefois, il faudrait pouvoir déterminer pourquoi les porteurs de JP2 (qui a la forme d'un pathogène traditionnel) présentent des signes cliniques et une progression de la maladie bien plus importants que ceux qui n'en sont pas porteurs (ou porteurs mais en faible quantité). Existe-t-il d'ailleurs une notion de seuil infectieux en-dessous duquel ce clone pourrait avoir une action limitée voire nulle ?

Sur l'échantillon précédent, Dorte Haubek a tenté de comparer les signes cliniques, l'étendue et la sévérité des pertes d'attaches entre les patients atteints d'EOP, porteurs ou non du clone JP2 (figures 7 et 8) [23].

Number of teeth with attachment loss ≥ 3 mm	Frequency of EOP-patients with JP2-type of <i>A. a</i> (n = 15)	Frequency of EOP-patients without JP2-type of <i>A. a</i> (n = 24)
1	3 (20.0)	14 (58.3)
2	2 (13.3)	2 (8.3)
3	1 (6.7)	1 (4.2)
4	3 (20.0)	3 (12.5)
5	1 (6.7)	2 (8.3)
7	1 (6.7)	1 (4.2)
8	1 (6.7)	0
9	1 (6.7)	0
11	1 (6.7)	0
15	1 (6.7)	0
16	0	1 (4.2)

Figure 7 - Répartition des patients malades en fonction du nombre de dents avec perte d'attache ≥ 3 mm et de la présence du clone JP2 [23].

Microbiological findings	Number of individuals, n	Number of affected teeth		Attachment loss (mm)	
		Mean (SD)	Median (1st and 3rd quartile)	Mean (SD)	Median (1st and 3rd quartile)
Plaque samples with JP2-type of <i>A. a</i>	15	5.1 (4.1)	4.0 (2.0 and 8.0)	4.3 (1.2)	4.0 (3.3 and 5.4)
Plaque samples without JP2-type of <i>A. a</i>	24	2.8 (3.3)	1.0 (1.0 and 4.0)	3.4 (0.8)	3.0 (3.0 and 3.3)

Figure 8 - Nombre de dents atteintes par individu et perte d'attache par dent, avec ou sans clone JP2 [23].

Parmi les 45 patients atteints d'EOP, seuls 15 des 39 échantillons cultivables sont positifs pour le clone JP2. Les autres peuvent ou non être colonisés par d'autres types d'*A. actinomycetemcomitans*. Les sites de prélèvement sont essentiellement les incisives et les premières molaires.

On peut constater que les patients atteints d'EOP et porteurs du clone JP2 ont un nombre plus élevé de dents avec une perte d'attache ≥ 3 mm.

De plus, parmi les porteurs de JP2, les dents ont des pertes d'attaches significativement plus importantes que celles des non porteurs de JP2. Lorsque le clone JP2 est présent, la perte d'attache est globalement plus importante au moment de l'observation.

L'infection par le clone JP2 constitue donc un facteur de risque de développement d'une EOP et ce, avec des lésions plus sévères que les patients non porteurs. Les localisations des lésions entre les deux configurations sont relativement semblables, néanmoins les prémolaires sont plus atteintes (probablement aussi plus précocement) chez les porteurs de JP2 (figure 9) [23].

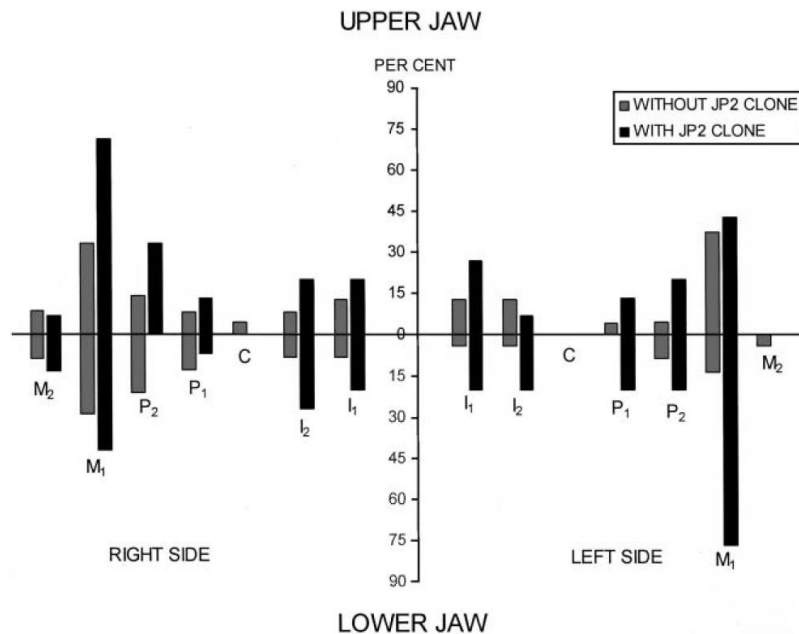


Figure 9 - Proportion des dents avec perte d'attache ≥ 3mm chez les patients atteints d'EOP en fonction de la présence du clone JP2.

Cette étude, malgré le nombre limité de patients, montre des différences significatives entre les deux groupes soulignant le plus grand degré d'évolution de la maladie des patients infectés par le clone JP2. Malgré ses caractéristiques de pathogène traditionnel, ces relevés laissent supposer un modèle de progression distinct, ainsi qu'une extrême virulence de ce clone ou d'une population bactérienne caractérisée par la présence de ce clone.

Afin d'évaluer au mieux cette progression particulière, une partie des individus examinés auparavant donnèrent leur accord pour être réexaminés deux ans plus tard. Aucun traitement parodontal particulier n'aura été prodigué. Sur les 121 adolescents marocains examinés, les prélèvements ont donné les résultats suivants :

- nombre de prélèvements JP2 seul = 5,
- nombre de prélèvements non JP2 = 38,
- nombre de prélèvements JP2 + non JP2 = 2.

Si l'on compare les valeurs de pertes d'attaches sur les 2 ans, on obtient les valeurs indiquées dans la figure 10.

	Baseline (n=301)	2 ans (n=121)	Progression CAL
CAL ≥ 1 mm	56,2 %	63,6 %	57,9 %
CAL ≥ 2 mm	37,2 %	55,4 %	47,9 %
CAL ≥ 3 mm	15,7 %	28,9 %	21,5 %
CAL ≥ 4 mm	6,6 %	11,6 %	5,8 %

Figure 10 - Proportion de sites selon la perte d'attache clinique.

Il est donc clair, avec ces données, qu'il y a une aggravation de la perte d'attache. Toutefois l'ensemble des patients est inclus dans ces statistiques. Certains patients sains ont développé une parodontite agressive, d'autres se sont aggravés tandis que d'autres encore, ont pu se stabiliser. Néanmoins, ces chiffres peuvent nous indiquer une certaine tendance à l'aggravation.

On constate par ailleurs que la présence initiale de JP2 est un indicateur prédictif d'une progression de perte d'attache ≥ 3 mm à 2 ans, ce qui n'est pas le cas pour les non JP2 (figure 11).

	Presence of CAL ≥ 3 mm at Baseline (n = 82) ^b		Adj. OR [CI] ^a	Two-year Progression of CAL ≥ 3 mm (n = 82) ^b		Adj. OR [CI] ^a
	Yes	No		Yes	No	
Positive for JP2 A. actinomycetemcomitans	6	1	39.9* [4.2; 375.6]	5	2	14.5* [2.5; 86.3]
Negative for JP2 A. actinomycetemcomitans	10	65	-	11	64	-
Positive for non-JP2 A. actinomycetemcomitans	7	33	1.1 [0.3; 4.0]	7	33	1.0 [0.3; 3.3]
Negative for non-JP2 A. actinomycetemcomitans	9	33	-	9	33	-

^a Adj. OR: Adjusted odds ratio, where [CI] denotes the 95% confidence intervals.

^b Results for cultivation of plaque samples at baseline were available for 82 of the 121 subjects included in the follow-up.

* p < 0.01.

Figure 11 - Odds ratios ajustés pour l'association des clones JP2 et non JP2 et la présence et la progression d'une perte d'attache ≥ 3 mm [25].

La figure 12 confirme la tendance à l'aggravation, mais elle montre surtout le différentiel important (statistiquement significatif) en terme de quantité de perte d'attache des patients porteurs du clone JP2 par rapport aux autres. Il est même surprenant de constater que les porteurs de l'A. actinomycetemcomitans non JP2 suivent un mode de progression quasi identique à celui des non porteurs d'A. actinomycetemcomitans (pas de différence significative). Attention, cela ne veut pas nécessairement dire que la présence d'A. actinomycetemcomitans non JP2 n'est pas corrélée à l'aggravation des signes parodontaux. En effet, comme évoqué précédemment, ne pas détecter A. actinomycetemcomitans ne signifie pas qu'il ne soit pas présent, du fait du manque de sensibilité de la technique d'évaluation. D'autre part, on peut considérer que les mécanismes d'évolution des parodontites agressives des patients, où ne sont pas relevés A. actinomycetemcomitans et où l'on retrouve du non JP2, sont complètement différents de celui où JP2 est détecté. On peut alors émettre l'hypothèse qu'il existe deux types de maladies parodontales agressives dont l'une est caractérisée par la présence d'une bactérie, comme évoqué dans l'introduction. Néanmoins, il ne faut pas négliger la possible permissivité de l'hôte.

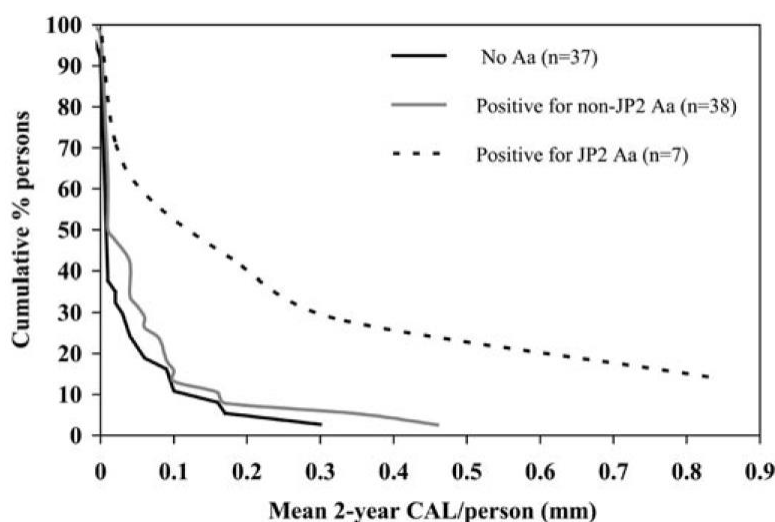


Figure 12 - Fréquence cumulée des patients en fonction de la perte d'attache moyenne à 2 ans, pour les patients positifs à JP2, non JP2 et sans A. actinomycetemcomitans [25].

Il s'agit ici de la première étude qui montre que la présence de JP2 résulte en un risque plus important de progression de perte d'attache sur 2 ans. Il reste toutefois encore à montrer comment il joue un rôle dans son initiation.

Afin d'éclaircir ce mécanisme, Dorte Haubek réalise une étude longitudinale sur 700 enfants scolarisés (moy. : 12,6 ans) et au parodonte sain sur une période de 2 ans. Le but de l'étude est d'observer et d'étudier la conversion en parodontite sur un échantillon de patients suffisamment important [30].

L'examen des hauteurs d'attache clinique est réalisé au début de l'étude, puis à 2 ans et comprend 56 sites de mesure par individu. Un patient est considéré comme malade lorsqu'il présente une perte d'attache ≥ 3 mm. Par ailleurs, des échantillons de plaque sont prélevés lors des examens, au niveau incisif et molaire, afin de rechercher la présence du clone JP2 (par PCR à l'aide des primers ltx3 et ltx4).

Sur les 700 individus inclus initialement, seuls 428 ont accédé à la deuxième étape de l'examen. De même, 61 d'entre eux ont développé une perte d'attache ≥ 3 mm. En terme de répartition, aucune différence significative n'a été enregistrée ni en fonction du sexe ni en fonction du site de prélèvement (incisif ou molaire).

Cette étude montre clairement qu'être contaminé par le clone JP2 seul (RR : 18) ou par une combinaison JP2 + non JP2 (RR : 12,4) augmente fortement le risque de perte d'attache sur 2 ans (figures 13 et 14). Même s'il existe, ce risque est nettement moins prononcé chez les porteurs de non JP2 seul, voire les non porteurs d'A. actinomycetemcomitans.

JP2	non-JP2	CAL ≥ 3 mm	CAL < 3 mm	Crude RR	95% CI
+	+	13	14	12.4	(5.2-29.9)
+	-	16	7	18.0	(7.8-41.2)
-	+	26	197	3.0	(1.3-7.1)
-	-	6	149	1.0	Reference

Individuals were considered positive for the respective genotypes of Aa if one or both of the two pooled plaque samples collected were positive for the respective genotypes.

Figure 13 - Tableau récapitulatif des risques relatifs de perte d'attache ≥ 3 mm en fonction des clones d'A. actinomycetemcomitans détectés [30].

Pour les individus sans A. actinomycetemcomitans détecté, 79,4 % sont sains après 2 ans, tandis que seulement 17,4 % des porteurs de JP2 seul ne montrent aucune perte d'attache (figure 14).

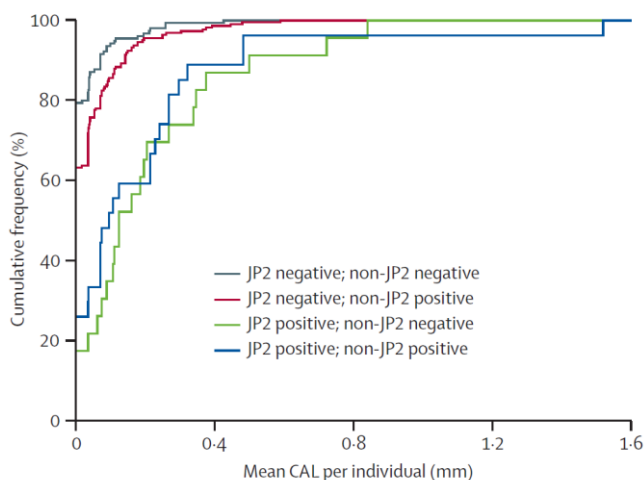


Figure 14 - Fréquence cumulée de perte d'attache sur 2 ans en fonction des détectations de JP2 et non JP2. Les segments verticaux représentent les pourcentages pour chaque valeur de perte d'attache [30].

Chacun des patients peut donc être positif ou négatif à JP2 ou non JP2 dans un, deux, voire aucun des prélèvements effectués (figure 15). Ce tableau répartit les 428 individus de l'étude en neuf combinaisons en fonction du risque relatif de développer une perte d'attache ≥ 3 mm (note : la division en groupes diminue la précision du risque relatif, car elle diminue la taille de l'échantillon). On constate que chez un patient, la présence simultanée de JP2 et de non JP2 est associée à un risque relatif inférieur (12,4) que la présence de JP2 seul (18), mais supérieur à la présence de non JP2 seul (3).

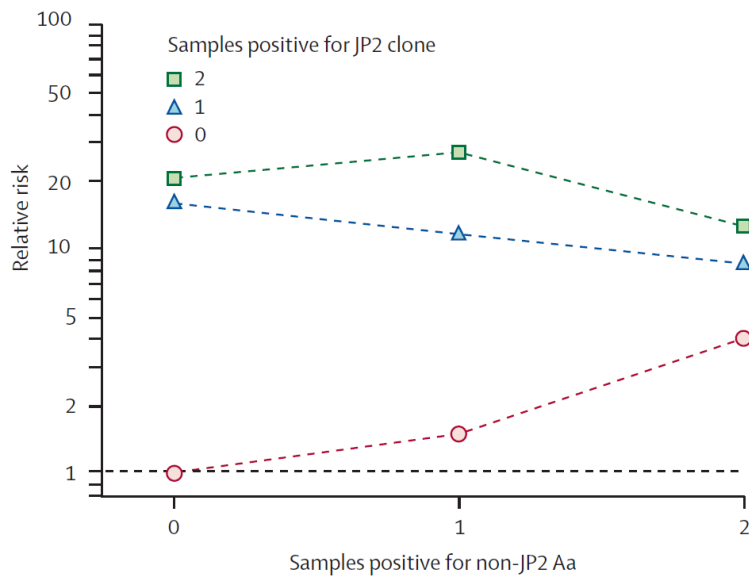


Figure 15 - Risque relatif de développer une perte d'attache ≥ 3 mm en fonction du nombre d'échantillons positifs pour JP2 [30].

Ces observations nous montrent que le clone JP2 est présent avant l'apparition de la maladie et qu'il existe une relation temporelle entre la présence d'*A. actinomycetemcomitans* et la parodontite agressive chez ces adolescents. Le mode de destruction chez les porteurs de JP2 suit le même modèle que les autres, néanmoins sa progression est nettement plus rapide.

Dans cette étude, les pourcentages d'*A. actinomycetemcomitans*, et plus spécifiquement de JP2, sont plus importants que dans les autres études sur le sujet. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation du volume de l'échantillon ainsi que par des méthodes de détection de plus en plus sensibles. De même, l'échantillon est globalement plus jeune, ce qui signe la capacité de la bactérie à contaminer de jeunes patients.

Il existe donc des interconnexions complexes entre l'hygiène orale, une certaine prédisposition génétique et une composition de flore microbienne avec une virulence particulière. La détection de JP2 pourrait-elle permettre de détecter des individus plus à risque de développer une maladie parodontale agressive ?

La délétion entraîne un accroissement de la virulence par une augmentation de la sécrétion de leucotoxines, mais cela ne doit pas être la seule propriété responsable de cette différence de virulence inter-espèces. Par ailleurs, la différence entre les risques relatifs pour JP2 seul et les combinaisons d'*A. actinomycetemcomitans* suggère deux hypothèses. D'une part, il se peut qu'il y ait compétition entre JP2 et non JP2 pour une même niche écologique, d'autre part, il pourrait exister une relation dose ou temps-dépendante entre la concentration en JP2 et la sévérité de la maladie.

Cette étude prouve la relation entre JP2 et le développement de la maladie chez les Marocains, toutefois on ne peut être sûr que JP2 est le seul agent pathogène et qu'il n'interagit pas avec d'autres composants du biofilm dans une réaction destructrice en chaîne.

Le fait que le clone JP2 n’infecte préférentiellement que des individus jeunes [16] fait supposer que celui-ci n’est pas une bactérie persistante de la flore. Des prélèvements initiaux, puis à un et deux ans ont été effectués sur le précédent groupe de patients (365 patients) afin de tester la stabilité du clone JP2 après infection de l’hôte (2 pools par patient, 4 échantillons molaires et 4 échantillons incisifs) (figure 16) [31].

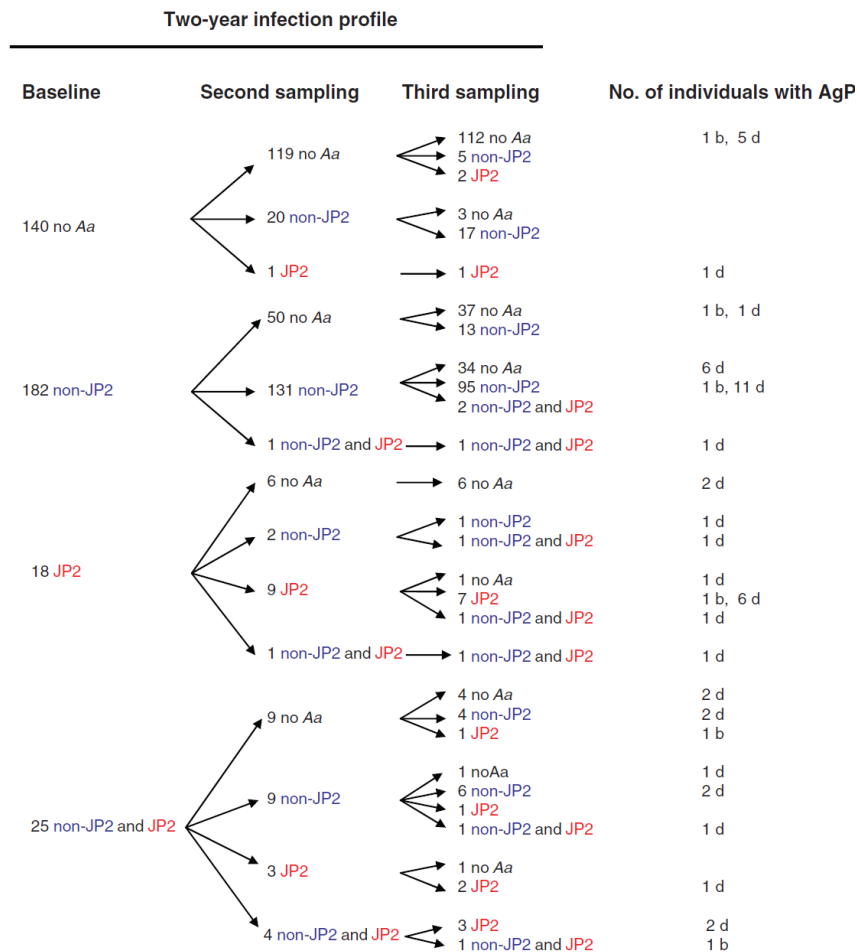


Figure 16 - Répartition des 365 patients en fonction des différents prélèvements [31].

À l’examen des relevés, on constate que sur 25 patients co-infectés (JP2 + non JP2) à t=0, seuls deux le restent à 2 ans. Ceux présentant JP2 seul montrent 50 % de maintien à 2 ans, tandis que les non JP2 montrent 61 % de maintien (les coprésences à 1 et 2 ans sont incluses).

Parmi les 43 individus positifs à JP2 initialement (mono- ou coprésence), 15 le sont durant les deux années de suivi. Toujours parmi ces 43 sujets, 3 souffraient initialement d’une parodontite agressive, tandis que 24 initialement sains ont développé une parodontite agressive au cours de l’étude :

- JP2 seul à t=0 seulement : 46 % (10/22) de risque de parodontite agressive,
- JP2 sur 2/3 prélèvements : 60 % (3/5),
- JP2 sur 3/3 prélèvements : 85 % (11/13).

Pour les sujets positifs initialement et à 2 ans, mais négatif au prélèvement intermédiaire, un défaut de sensibilité de la méthode est avancé. Ceci peut rentrer en compte pour les autres échantillons.

Cette étude montre la stabilité du clone JP2 sur 2 ans pour au moins un tiers des individus contaminés au départ. De plus, un individu infecté sur une longue période présente plus de risque de développer une parodontite agressive.

Par ailleurs, ceux atteints par du non JP2 au départ ont tendance à être colonisés par d'autres clones avec une longueur complète de promoteur. Du fait de leur hétérogénéité génomique, on ne peut rien conclure quant à la stabilité de leur colonisation.

Plus de la moitié des porteurs de JP2 (mono- ou coprésence) à t=0 n'ont été colonisés que transitoirement et seulement 2 % (sur les 365) n'ont été colonisés que par JP2 sur une durée de 2 ans. Ces données peuvent être le reflet d'une augmentation de l'âge de la population combinée à l'idée de « fenêtre temporelle » pour l'infection à JP2 tôt dans l'enfance.

Il existerait donc une notion de dose temporelle (et non quantitative) pour la contamination à JP2, car plus l'exposition est longue (3 échantillons positifs), plus le risque de découvrir une parodontite agressive est grand en comparaison de ceux où l'infection est transitoire (1 ou 2 échantillons positifs). De même, le moment de la contamination par rapport à la fenêtre influe sur le risque, car il conditionne la durée d'exposition.

Une proportion d'individus n'ayant que JP2 initialement développe tout de même une parodontite. Le clone JP2 peut initier la maladie, mais il n'est pas forcément nécessaire pour maintenir le processus de destruction. S'agit-il d'une tolérance immunologique affectée ou bien JP2 serait-il sous le seuil de détection et maintiendrait ainsi la résorption osseuse ? En effet, une fois la poche créée, le milieu devient favorable à une flore pathogène, même en présence d'A. *actinomyetemcomitans*.

Concernant la co-infection JP2 et non JP2, celle-ci serait instable en comparaison aux mono-infections. Il s'agit donc d'un argument en faveur de la notion d'exclusion compétitive pour une même « niche ».

3.3. ASSOCIATION AVEC UN HÔTE SPÉCIFIQUE

Comme évoqué précédemment, le clone JP2 est géographiquement répandu, mais il n'est retrouvé que chez certains types d'hôtes, à savoir des individus appartenant à des ethnies spécifiques. Pour expliquer cette situation, deux hypothèses prédominent. Selon la première, des caractéristiques génétiques spécifiques à ces hôtes permettraient le développement de cette bactérie. Selon la seconde, cette restriction serait due à un mode de transmission particulier, limitant la dissémination de JP2 entre groupes d'individus, donc entre les ethnies [32].

Une première évaluation comparative d'Haubek et Poulsen en 1995 [18] sur des Finlandais sains et atteints de parodontite chronique ou agressive n'a pas permis de détecter de clone particulièrement virulent au sein des différentes flores. De plus, il n'existe aucune preuve que ce clone ait été disséminé parmi les Caucasiens et les Asiatiques, et ce malgré les flux migratoires des populations Africaines dans ces continents (*figure 17*) [19][29].



Figure 17 - Illustration de la dissémination géographique du clone JP2 [32].

Il a donc été conclu que dans les populations nord-africaines, *A. actinomycetemcomitans* joue un rôle de pathogène opportuniste aussi bien dans la parodontite chronique (anciennement *parodontite de l'adulte*) que dans la parodontite agressive localisée (anciennement *parodontite juvénile*).

Plus tard, les échantillons de plaque de 17 patients danois et suédois (adolescents et jeunes adultes) atteints de parodontite agressive furent examinés, à la recherche du clone JP2. La délétion de 530 pb fût retrouvée parmi 11 des sujets malades (12 à 21 ans) à l'intérieur de cinq familles originaires des Îles du Cap Vert, du Maroc ou d'Algérie. Sur les six restants, provenant du Maroc et du Koweït, seulement deux présentait de l'*A. actinomycetemcomitans* cultivable, mais sans la délétion de 530 pb [19]. De même, d'autres observations sur des échantillons aux États-Unis montrent que le clone JP2 n'est retrouvé que chez les jeunes patients afro-américains atteints de parodontite agressive.

Ces faisceaux d'indices, associés à l'augmentation de la prévalence des parodontites agressives chez les patients d'origine africaine [41], suggèrent très fortement que cette bactérie est associée à certaines populations. Malgré la séparation sociale des différentes ethnies dans ces pays, comment expliquer que ce clone n'ait pas été transféré aux Caucasiens s'il n'y a pas de tropisme particulier. En effet, les nourrices afro-américaines s'occupaient d'enfants blancs au moment où la majorité de la flore buccale à cet âge précoce est acquis de la mère ou d'autres personnes proches, et ce sans qu'aucun cas de parodontites agressives *via* JP2 ne soit retrouvé [29]. Il faudrait déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de ce tropisme afin d'évaluer le risque de transmission à d'autres populations.

Pour certains, l'augmentation de cette prévalence de parodontites agressives au sein de ces populations n'est due qu'à la susceptibilité intrinsèque d'être contaminé par *A. actinomycetemcomitans* plutôt qu'à un potentiel pathogénique particulier, en dépit des observations sur le clone JP2 [29][37].

L'idée d'un hôte avec des caractéristiques génétiques spécifiques fût écartée, car il n'existerait pas de différences entre cellules spécifiques parmi les différentes ethnies. De même, si les fréquences de distribution géographique varient pour ce clone, aucun élément n'étaye la validité de la composante génétique [32]. Cet élément paraît tout de même peut crédible dans la mesure où seuls des individus nord-africains sont atteints.

De plus, il a déjà été démontré que les bactéries sous-gingivales seules ne peuvent aboutir à la destruction parodontale. Bien qu'elles soient essentielles pour l'initiation de la maladie, la quantité de plaque et les espèces bactériennes en présence ne sont pas nécessairement corrélées avec la sévérité de la parodontite. Chaque personne doit donc posséder une réponse dose-dépendante individuelle à la plaque en présence qui détermine sa susceptibilité à la parodontite [40].

Une autre hypothèse suppose que JP2 possède un faible niveau de transmissibilité et que son acquisition est restreinte à une courte période de l'enfance par transmission verticale, associée à la séparation sociale des différentes ethnies, limitant sa dissémination [32].

Si l'on considère que la contamination est transitoire et que la quantité de JP2 diminue à l'âge adulte (jusqu'en-dessous du seuil de détection), on peut se demander comment cela peut suffire à le transmettre un jeune individu et expliquer sa forte concentration. On pourrait supposer que ces jeunes patients aient été protégés lors de leurs premières années d'existence par des anticorps « anti-JP2 » maternels. Par la suite, les concentrations en anticorps ayant diminué, elles auraient laissé le champ libre au développement de la bactérie et à son action hautement pathogène. La diminution des concentrations de JP2 s'expliquerait par la réponse immunitaire adaptative et la sécrétion d'anticorps « anti-JP2 » par les plasmocytes de l'hôte. Dans cette hypothèse, le problème se poserait de comprendre pourquoi seul le clone JP2 serait concerné et pas l'ensemble des bactéries de la poche.

Les parodontites agressives localisées (anciennement parodontites juvéniles) pourraient donc se diviser en deux types de pathologies. La première, retrouvée partout dans le monde et concernant une diversité

importante d'*A. actinomycetemcomitans* qui agit tel un pathogène opportuniste, la seconde plus restreinte, intéressant un clone particulier hautement leucotoxique se comportant comme un pathogène exogène [43]. Une nuance reste à apporter, ce n'est pas parce que l'on retrouve cette bactérie très leucotoxique avec des destructions parodontales importantes qu'il faut établir un lien de cause à effet direct. Il ne faut pas oublier qu'il existe un environnement bactérien avec des interactions complexes entre les espèces et qu'une mono-infection ne peut pas être démontrée pour l'instant.

Enfin, il reste à savoir s'il existe des signes cliniques permettant de différencier ces deux types de pathologies [43].

3.4. MODES DE TRANSMISSION

Le clone JP2 est détecté en très grande majorité chez les adolescents et jeunes adultes ayant des origines africaines, car il est présent de façon endémique dans cette région du globe. Des études intrafamiliales ont démontré la transmission horizontale et verticale de l'*A. actinomycetemcomitans* par de probables transferts de salive [1][2][3][9][47].

Les pistes recherchées se portent sur les habitudes d'hygiène et habitudes alimentaires socioculturelles de ces populations, notamment le partage de la brosse à dents ainsi que l'usage d'un plat unique pour toute la famille. En effet, il a été mis en évidence que les brosses à dents peuvent être contaminées par *A. actinomycetemcomitans* pendant une heure [46], augmentant ainsi le risque de transmission.

Cependant, pour ce qui concerne le clone JP2, le partage de la brosse à dents ne montre pas de corrélation positive avec la présence d'*A. actinomycetemcomitans*, ce qui signifie que cette pratique ne serait pas impliquée dans sa transmission horizontale (figure 18).

Question related to toothbrushing	Possible answers	No. (%)	Occurrence of <i>Aa</i> (%)	Odds ratio [95% CI]
Do you use other family members' toothbrush?	Yes	24 (20.3)	7 (29.2)	0.80 [0.30; 2.12]
	No	94 (79.7)	32 (34.0)	
Do other family members use your toothbrush? ^a	Yes	22 (19.0)	6 (27.3)	0.76 [0.27; 2.14]
	No	94 (81.0)	31 (33.0)	

Figure 18 - Relation entre les comportements d'hygiène et la contamination par *A. actinomycetemcomitans* [26]. Légende : ^a = deux participants ne savaient pas si d'autres membres de la famille partageaient leur brosse à dent, abaissant le total d'individus inclus à 116.

Concernant les habitudes alimentaires, les patients sont divisés en score à risque faible (≤ 4) et à risque fort (≥ 5) en fonction des différents comportements de partage proposés. Les réponses peuvent être « quotidiennement », « parfois » et « jamais » et sont respectivement codées avec un score de 2, 1 et 0.

Les habitudes de partage alimentaire montrent une association positive avec la présence de l'*A. actinomycetemcomitans* non JP2 et pour toutes les formes d'*A. actinomycetemcomitans* confondues. L'association est également positive pour les JP2, mais le faible échantillon rend l'estimation peu précise (figure 19).

Questions related to eating and drinking habits	Possible answers	Proportion
Do you eat from the same plate as others?	Daily	73.1%
	Sometimes	21.8%
	Never	5.0%
Do you drink of the same glass as others?	Daily	56.3%
	Sometimes	13.4%
	Never	30.3%
Do you drink from the same bottle as others?	Daily	16.8%
	Sometimes	47.9%
	Never	35.3%
Do you bite off the same food as others?	Daily	26.9%
	Sometimes	46.2%
	Never	26.9%
Do you taste the same sweets as others?	Daily	3.4%
	Sometimes	20.2%
	Never	76.5%

Figure 19 - Distribution des sujets en fonction des habitudes alimentaires [26].

La différence moyenne de dents avec une perte d'attache ≥ 3 mm entre haut et faible risque est de 0,91 (soit 1 dent). De la même façon, la perte d'attache clinique globale est plus importante parmi les individus à haut risque que ceux au risque faible (figures 20 et 21).

	JP2-type of <i>Aa</i>		Non-JP2 type of <i>Aa</i>		Any type of <i>Aa</i>	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Transmission risk behavior						
HRB ^a	6	8.8	24	35.3	29	42.6
LRB ^b	1	2.0	9	18.0	10	20.0
OR ^c [95% CI]	4.74 [0.55; 40.71]		2.49 [1.03; 5.97]		2.97 [1.28; 6.91]	

^aHRB: high transmission risk. ^bLRB: low transmission risk. ^cOR: Odds ratio.

Figure 20 - Relation en comportements alimentaires à risque et présence d'*A. actinomycetemcomitans* [26].

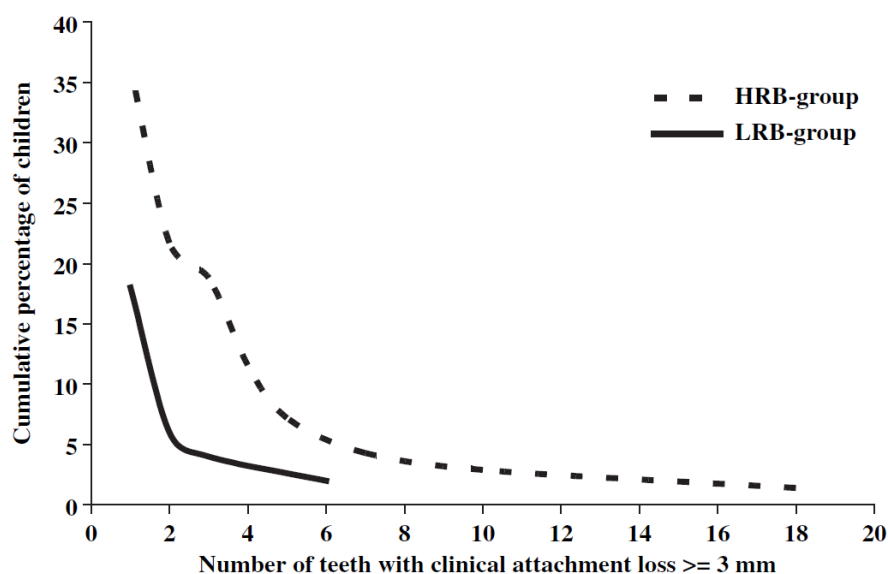


Figure 21 - Fréquence cumulée des sujets en fonction du nombre de dents avec une perte d'attache ≥ 3 mm et type de comportement à risque [26]. Légende : HBR-group = high risk behaviour group ; LRB-group = low risk behaviour group.

Cette étude montre que le partage de nourriture et de boisson constitue un risque d'être contaminé par *A. actinomycetemcomitans* (quel qu'il soit) et de présenter ainsi une perte d'attache supplémentaire. Aucune association n'est démontrée avec le partage de la brosse à dents. Ceci peut s'expliquer par le fait que les différents membres des familles utilisent la brosse à divers moments de la journée, rendant l'heure de contamination précédemment évaluée insuffisante pour la transmission de la bactérie entre les hôtes. Une autre hypothèse, indépendamment du temps de survie des bactéries sur la brosse suggère que l'individu peut être en contact avec le clone JP2, mais qu'il doit être génétiquement et écologiquement permissif à la colonisation et surtout au maintien de la bactérie dans la cavité buccale.

Durant les repas, les contacts avec les différentes personnes sont plus longs. Il y a un risque élevé d'acquisition de micro-organismes pendant ces événements. La bactérie peut-elle donc se retrouver au sein de la nourriture et réaliser un trajet bouche-plat-bouche ? Cela suggère également que la transmission n'est pas uniquement intrafamiliale, mais peut l'être entre individus ayant des comportements considérés comme à risque.

4. CONCLUSION

Aggregatibacter actinomycetemcomitans est une bactérie incontournable lorsque l'on s'intéresse à la microbiologie de la parodontite. L'existence d'un clone très agressif associé à la présence d'une maladie parodontale agressive tend à valider, dans ce cas de figure, la notion de plaque bactérienne spécifique. Toutefois, il n'existe aucune preuve qu'il s'agisse d'une mono-infection, c'est-à-dire que cette bactérie soit la seule responsable des destructions provoquées.

Pour une population donnée, être simplement contaminé par le clone JP2 tôt durant l'adolescence entraîne le plus souvent le développement d'une parodontite agressive dont l'évolution est plus intense et rapide que les formes « classiques » de parodontite agressive.

De nombreuses études sont nécessaires afin de déterminer les mécanismes de contamination et de pathogénie, mais certaines attitudes préventives pourraient permettre de limiter la transmission. La suppression des comportements « à risque » est envisageable, de même que l'examen systématique des membres d'une famille dont l'un a développé une parodontite agressive. Par contre, compte tenu de la fenêtre temporelle de contamination, il n'est pas pertinent de considérer une transmission au sein d'un même couple, mais plutôt le risque de transmission aux plus jeunes membres de cette famille.

L'existence d'un test microbien de routine pour rechercher la délétion ou l'activité leucotoxique permettrait peut-être de dépister des individus à risque et d'éliminer ce pathogène avant qu'il initie la maladie au cours de sa fenêtre d'action.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alaluusua S, Asikainen S, Lai CH. Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontol 1991; 62: 207-210.
2. Alaluusua S, Saarela M, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Ribotyping shows intrafamilial similarity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. J Periodontol 1993;8: 225-229.
3. Asikainen S, Chen C, Slots J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1996; 11: 387-394.
4. Baehni P, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Taichman NS. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. Infect Immun 1979;24:233-43.
5. Baehni PC, Tsai C-C, McArthur WP, Hammond BF, Shenker BJ, Taichman NS. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. Arch Oral Biol 1981;26:671-6.
6. Bandhaya P, Saraithong P, Likittanasombat K, Hengprasith B, Torrungruang K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes, the JP2 clone and cytolethal distending toxin genes in Thai population. J Clin Periodontol 2012; 39: 519-525.
7. Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. Infect Immun 1994;62:501-8.
8. Bueno LC, Mayer MPA, DiRienzo J.M. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. J Periodontol 1998;69:998-1007.
9. DiRienzo JM, Slots J, Sixou M, Sol M-A, Harmon R, McKay TL(1994). Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. Infect Immun 62:3058-3065.
10. Ennibi K, Chadi B, Bouziane A, Haubek D & Poulsen K. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in localized and generalized forms of aggressive periodontitis Acta Odontologica Scandinavica, 2012; Early Online, 1-5.
11. Eriksen KT, Haubek D, Poulsen K. Intragenomic recombination in the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Microbiology 2005;151:3371-9.
12. Gunsolley JC, Tew JG, Gooss CM, Burmeister JA, Scheinkein HA. Effects of race and periodontal status on antibody reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. J Periodontal Res 1988;23:303-7.
13. Guthmiller JM, Lally ET, Korostoff J. Beyond the specific plaque hypothesis: Are highly leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* paradigm for periodontal pathogenesis? Crit Rev Oral Biol Med 2001;12:116-24.
14. Haase EM, Zmuda JL, Scannapieco FA. Identification and molecular analysis of rough-colony specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun 1999;67: 2901-8.

15. Haase EM, Stream JO, Scannapieco FA. Transcriptional analysis of the 5' terminus of the flp fimbrial gene cluster from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiology* 2003;149:205-15.
16. Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EMB, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, et al. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2000A;71:912-22.
17. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000B;71: 1554-60.
18. Haubek D, Poulsen K, Asikainen S, Kilian M. Evidence for absence in Northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1995;33:395-401.
19. Haubek D, Poulsen K, Westergaard J, Dahlen G, Kilian M. Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. *J Clin Microbiol* 1996;34:1576-8.
20. Haubek, J M Dirienzo, E M Tinoco, J Westergaard, N J López, CP Chung, K Poulsen and M Kilian. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35(12):3037.
21. Haubek D, Tinoco EM, Westergaard J, Lopez NJ, Chung CP, Poulsen K, et al. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Microbiol* 1997A;35:3037-42.
22. Haubek D, Ennibi O-K, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 2001;80:1580-3.
23. Haubek D, Ennibi O-K, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2002;29:657-60.
24. Haubek D, Westergaard J. Detection of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. *Int J Paediatr Dent* 2004;14:41-8.
25. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Benzarti N, Baelum V. The highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and progression of periodontal attachment loss. *J Dent Res* 2004;83:767-70.
26. Haubek D, Ismaili Z, Poulsen S, Ennibi O-K, Benzarti N, Baelum V. Association between sharing of toothbrushes, eating and drinking habits and the presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Moroccan adolescents. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:195-8.
27. Haubek D, Havemose-Poulsen A, Westergaard J. Aggressive periodontitis in a 16-year-old Ghanaian adolescent, the original source of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain HK1651 – a 10-year follow up. *Int J Paediatr Dent* 2006;16:370-5.
28. Haubek D, Ennibi O-K, Væth M, Poulsen S, Poulsen K. Stability of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 2009; 88:856-60.
29. Haubek D, Poulsen K, Kilian M. Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 2007;75:3080-8.

30. Haubek D, Ennibi O-K, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008;317:237-42.
31. Haubek D, O.-K. Ennibi, M. Væth, S. Poulsen, and K. Poulsen. Stability of the JP2 Clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* *J Dent Res* 2009;88(9):856-860.
32. Haubek D. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. School of Dentistry Faculty of Health Sciences Aarhus University Denmark 2010.
33. He T, Nishihara T, Demuth DR, Ishikawa I. A novel insertion sequence increases the expression of leukotoxicity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* clinical isolates. *J Periodontol* 1999;70: 1261-8.
34. Henderson B, Ward J, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) Actinomycetemcomitans*: a triple A periodontopathogen? *Periodontology* 2000 2010;54(1),78-105.
35. Johansson A, Claesson R, Hanstrom L, Sandstrom G, Kalfas S. Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2000A;35:85-92.
36. Johansson A, Sandstrom G, Claesson R, Hanstrom L, Kalfas S. Anaerobic neutrophil-dependent killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in relation to the bacterial leukotoxicity. *Eur J Oral Sci* 2000B;108:136-46.
37. Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D, Fine DH. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol* 2002;40:1181-7.
38. Kato S, Kowashi Y, Demuth DR. Outer membranelike vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* 2002;32:1-13.
39. Kelk P, Johansson A, Claesson R, Hanstrom L, Kalfas S. Caspase 1 involvement in human monocyte lysis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun* 2003;71:4448-55.
40. Laine M, Crielaard W, Loos B. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontology* 2000 2012;58(1):37-68.
41. Løe, H., and L. J. Brown. 1991. Early onset periodontitis in the United States of America. *J. Periodontol.* 62:608-616.
42. Macheleidt A, Muller H-P, Eger T, Putzker M, Fuhrmann A, Zoller L. Absence of an especially toxic clone among isolates of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* recovered from army recruits. *Clin Oral Invest* 1999A;3:161-7.
43. Macheleidt A, Muller H-P, Eger T, Putzker M, Zoller L. Clonal diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from young adults with minimal periodontal disease. *J Periodontal Res* 1999B;34:179-87.
44. Marsh, PD. The significance of maintaining the stability of the natural microflora of the mouth. *Br Dent J.* 1991 Sep 21;171(6):174-7.
45. Maynard Smith, J. 1995. Do bacteria have population genetics, p. 1-12. In S. Baumberg, J. P. W. Young, E. M. H. Wellington, and J. R. Saunders (ed.), *Population genetics of bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

46. Muller HP, Lange DE, Muller RF. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* contamination of toothbrushes from patients harbouring the organism. J Clin Periodontol 1989;16:388-390.
47. Petit MDA, Van Steenberghe TJM, De Graaff J, Van der Velden U. Transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families of adult periodontitis patients. J Periodontal Res 1993;28:85-100.
48. Poulsen K, Theilade E, Lally ET, Demuth DR, Kilian M. Population structure of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a framework for studies of disease-associated properties. Microbiology 1994;140:2049-60.
49. Rylev, M, M. Bek-Thomsen, J. Reinholdt, O.-K. Ennibi, M. Kilian. Microbiological and immunological characteristics of young Moroccan patients with aggressive periodontitis with and without detectable *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 infection Molecular Oral Microbiology 2011;26:35-51.
50. Spitznagel J, Kraig E, Kolodrubetz D. Regulation of leukotoxin and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun 1991;59:1394-401.
51. Takada K, Saito M, Tsuzukibashi O, Kawashima Y, Ishida S, Hirasama M. Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Molecular Oral Microbiology. 2010;25(3):200-6.
52. Theilade E. The non-specific theory in microbiological etiology of inflammatory periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1986;13(10):905-11.
53. Tsai C-C, Shenker BJ, DiRienzo JM, Malamud D, Taichman NS. Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymyxin B. Infect Immun 1984;43:700-705.
54. van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. Periodontol 2000 1999;20(1):122-35.
55. Xynogala I, Volgina A, DiRienzo JM, Korostoff J. Evaluation of the humoral immune response to the cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 in subjects with localized aggressive periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2009;24:116-23.