

II. Biologie de la cicatrisation papillaire

1- Rappels

Les traitements des maladies parodontales s'articulent autour de thérapeutiques, 1) non chirurgicales et antimicrobiennes (désinfection) qui visent à réduire la charge bactérienne et à supprimer l'inflammation, 2) chirurgicales pour débrider les surfaces radiculaires, éliminer le tissu de granulation, reconstruire les tissus détruits. Les études histologiques indiquent que les traitements parodontaux conventionnels (détartrages, surfaçages, lambeaux d'assainissement) aboutissent à un modèle cicatriciel de type réparation qui se traduira histologiquement par la formation d'un épithélium de jonction long (voir schéma ci-joint, d'après Wilson, 1999).

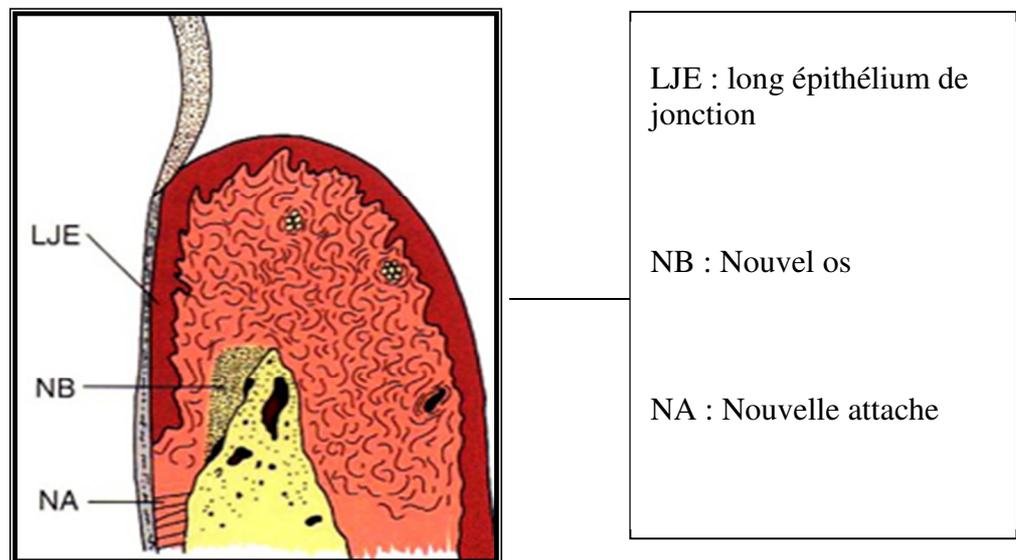
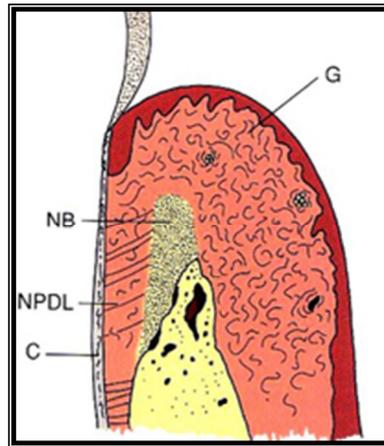


Figure 20a : Schéma représentant la réparation de l'épithélium après une thérapie de reconstruction papillaire avec nouvel os et attache formé (D'après Wilson, 1999)

L'alternative à la réparation est la régénération tissulaire (voir dessin ci-joint, d'après Wilson, 1999) qui se définit comme un processus biologique par lequel l'architecture et la fonction des tissus perdus sont totalement reconstruits aboutissant à la formation d'une nouvelle attache conjonctive, une néo-formation osseuse et un néo-cément.



G : Gencive
 NB : Nouvel os
 NPDL : Nouveau ligament parodontal
 C : Cément

Figure 20b : Schéma montrant la régénération tissulaire
 (D'après Wilson, 1999)

La connaissance des modifications biologiques lors d'une réaction inflammatoire ainsi que les mécanismes de cicatrisation, des tissus parodontaux, s'avère indispensable avant de décider et d'entreprendre un traitement.

2- Mécanismes de cicatrisation au niveau de la papille gingivale

Ce sont les étapes classiques, assimilables à celles de la cicatrisation des plaies, aboutissant à la formation d'un tissu de granulation avec de nombreux bourgeons vasculaires auxquels se mêlent des macrophages, des fibroblastes à l'intérieur d'un tissu conjonctif lâche.

Il convient, ici, de rappeler qu'elle se déroule selon 3 phases :

- La réaction inflammatoire
- La formation d'un tissu de granulation
- Le remodelage et la maturation

Il y a deux grands types de cicatrisation intéressent la papille inter-dentaire dans sa réparation ou sa reconstruction (Wikesjo et coll, 1992)

2.1 La cicatrisation de première intention

Elle se produit quand les deux berges d'une plaie peuvent être étroitement coaptées et lorsque les deux tissus sont de même nature (Mattson et Porth, 1990).

Au niveau épithéliale, les cellules migrent en direction apicale pour former un long épithélium de jonction qui s'arrête à une distance moyenne de 1 mm de la limite osseuse.

Au niveau conjonctif, elle est comparable au modèle cutané. Wikesjo (1992) décrit un précipité de protéines plasmatiques 10 minutes après accollement des surfaces puis une organisation de la matrice intercellulaire au bout de 6 heures.

A 1 jour, la phase inflammatoire augmente ;

A 3 jour le tissu de granulation se forme ;

A 7 jours des zones de cicatrisation complète sont observées (fibrines, neutrophiles)

A 14 jours, une attache physique fonctionnelle des fibres de collagènes néoformées à la dentine est constatée.

2.2 La cicatrisation de seconde intention

Elle se produit lorsque les deux berges de la plaie ne peuvent pas être coaptées et que 'une grande quantité de tissus a été détruite. La formation du tissu de granulation sera plus volumineuse.

Au niveau de l'épithélium et du conjonctif, les mécanismes de réparation seront identiques à la cicatrisation de première intention, mais le temps global de cicatrisation sera nettement plus long et la réaction inflammatoire plus intense.

2.3 Les principes biologiques de la cicatrisation parodontale par régénération

Bouchard et Etienne (1993) ont posé la base de ces principes :

- Histocompatibilité des surfaces : Surface radiculaire et face interne du lambeau saine
- Exclusion cellulaire : Limiter la progression apicale de l'épithélium
- Stabilité précoce du caillot : Protection lors des premières phases de cicatrisation
- Maintien de l'espace cicatriciel : Espace entre la face interne du lambeau et la surface radiculaire doit être suffisamment large pour permettre l'établissement d'un nouveau desmodonte et la croissance d'un os néoformé.
- Adhésion du caillot : Contact entre surface radiculaire et face interne du lambeau
- Induction cellulaire : Promotion des cellules dites « régénératrices »

3- Influence de la composition moléculaire de la papille inter-dentaire dans le processus cicatriciel

Csiszar et coll (2007) ont montré que la papille inter-dentaire présentait un potentiel de régénération inférieur par comparaison aux autres zones anatomiques de la gencive ainsi qu'une plus grande susceptibilité à la prolifération et à l'inflammation.

L'état de santé clinique de la papille inter-dentaire peut être défini, par la présence d'un certain degré d'inflammation locale, par le constat histologique lié à la présence de Pro-collagène de type I, Fibronectine A et B, Tenascine-C, TGF- β (Transforming growth factor ou facteur de croissance modifié), CTGF (Connective tissue growth factor ou facteur de croissance du tissu conjonctif), Molécule-signal SOS-1 (dérivée du gène SOS1). Ceci fournit l'explication de sa vulnérabilité et sa grande susceptibilité à l'inflammation.

La spécificité s'exprime par des propriétés moléculaires et cellulaires différentes par rapport à l'ensemble de la gencive.

De plus, le phénotype fibroblastique varie en fonction de l'origine de ces cellules.

Les molécules-clé dans la papille inter-dentaire et la gencive marginale ont été mises en évidence en comparant leur expression par coloration immuno-histochimique.

Chez sept sujets sains, des biopsies de la gencive marginale et de la papille inter-dentaire indemnes d'inflammation ont été réalisées. Une technique d'immuno-marquage, par anticorps primaires, (Anti-Cytokératine 19, Anti-TGF- β , Anti-SOS-1, Anti-Intégrine, $\alpha\beta6$, Anti-Procollagène de type 1, Anti-Decorine, Anti-Biglycan, Anti-Fibromoduline, Anti-Lumican, Anti-Fibronectine A et B (EDA et EDB), Anti-Tenascine-C, Anti-CTGF) a été réalisée.

Le temps de réaction pour chaque anticorps était standardisé pour toutes les zones d'intérêt des échantillons (2 à 4).

Au total, moins de 10 sections pour détecter chaque molécule au sein de la gencive marginale et papille inter-dentaire ont été utilisées pour les analyses.

L'intensité de la réaction de coloration a été évaluée par deux examinateurs indépendants pour chaque molécule de la gencive marginale et de la papille inter-dentaire, selon l'échelle suivante:

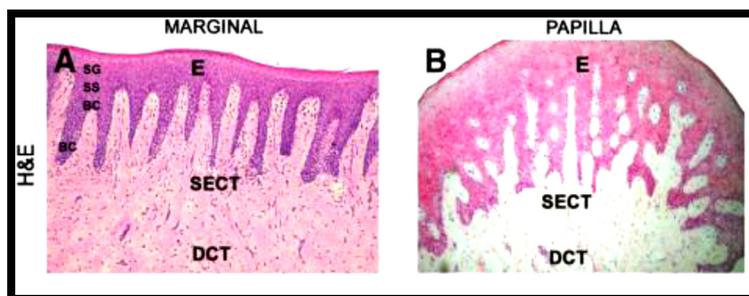
- 0= pas d'immuno-réactivité
- 1= faible mais intensité de coloration visible
- 2= modérée
- 3= forte intensité

Les résultats obtenus dans la gencive et la papille, pour chaque molécule, ont été comparés afin de déterminer les différences statistiquement significatives

Pour chaque sujet il a été utilisé une coloration avec l'hématoxyline et l'éosine afin de déterminer les caractéristiques morphologiques et l'analyse de la présence ou l'absence de cellules inflammatoires.

Seuls les tissus sans cellules inflammatoires ont été utilisés pour l'analyse.

3.1 Analyse histologique



E : Epithélium oral
BC : Cellules basales
SS : Stratum spinosum
SG: Stratum granulosum
SECT: Tissu conjonctif subépithélial
DCT : profondeur du tissu conjonctif

Figure 21 : Analyse histologique entre la gencive marginale et la papille inter-dentaire (D'après Csiszar et coll, 2007)

Dans la gencive marginale l'épithélium oral est kératinisée ; et il n'a été observé aucune inflammation.

Dans la papille inter-dentaire nous avons des zones parakératinisées (épithélium oral) et non-kératinisée (épithélium jonctionnel/sulculaire).

L'épithélium oral de la papille inter-dentaire apparaît plus épais que dans la gencive marginale.

Le nombre de fibroblastes semble équivalent dans les deux cas.

Par contre il y a une plus grande quantité de vaisseaux sanguins dans la papille inter-dentaire ainsi que la présence de zones inflammatoires (de légère à modérée).

3.2 Résultats de l'analyse immuno-histochimique au niveau de l'épithélium oral

Il existe une différence statistiquement significative dans l'expression des molécules cibles entre l'épithélium orale de la gencive marginale et celui de la papille inter-dentaire (Tableau 1) :

La Cytokeratine 19 n'est jamais exprimée dans l'épithélium oral de la gencive marginale (C) alors qu'il est fortement exprimé dans celui de la papille inter-dentaire (D) ($p < 0.001$).

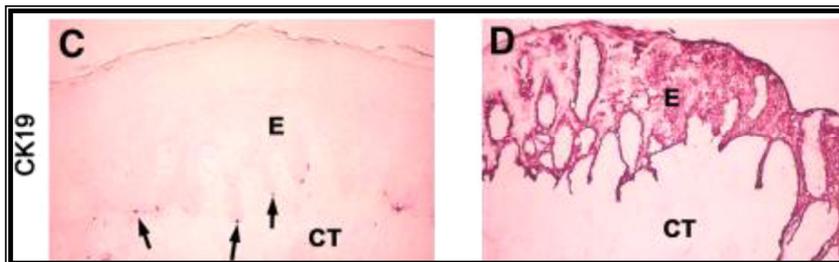


Figure 22 : Analyse histologique de la présence du marqueur CK19 entre la gencive marginale et la papille inter-dentaire (D'après Csiszar et coll, 2007)

L'Intégrine $\alpha\beta 6$ n'est pas détectée dans la gencive marginale (E) alors que le test de coloration est positif dans l'épithélium de la papille inter-dentaire (F) ($p < 0.001$ au niveau des cellules basales et $p < 0.05$ au niveau du stratum spinosum).

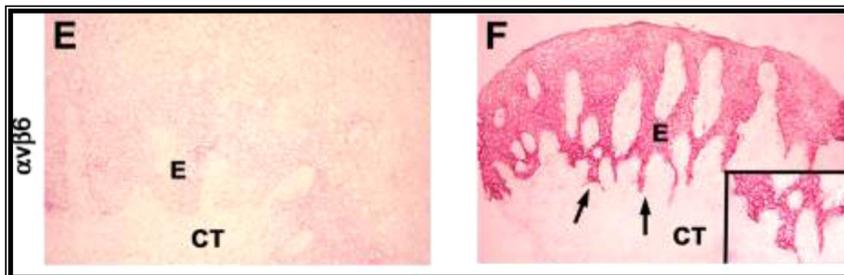


Figure 23 : Analyse histologique de la présence du marqueur Intégrine $\alpha\beta 6$ entre la gencive marginale et la papille inter-dentaire (D'après Csiszar et coll, 2007)

Le Biglycan est présent dans la gencive marginale surtout au niveau des cellules basales épithéliales et en faible quantité dans le stratum spinosum. Par contre sa présence est de modérée à forte dans l'ensemble de l'épithélium oral de la papille inter-dentaire ($p < 0.005$ au niveau du stratum granulosum et du stratum spinosum)

La Fibromoduline et le Lumican sont faiblement présents dans la gencive marginale (G et I) tandis qu'ils sont fortement exprimés dans la papille inter-dentaire (H et J) (surtout au niveau des cellules basales).

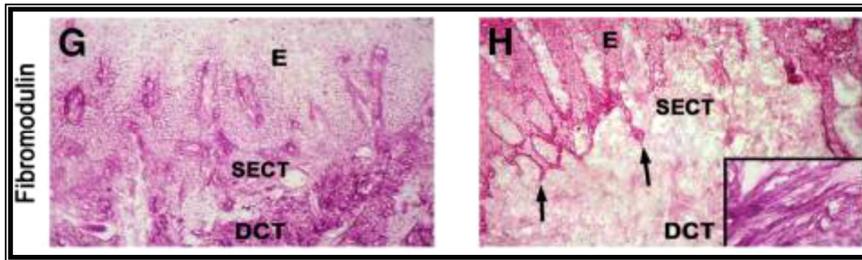


Figure 24 : Analyse histologique de la présence de Fibromoduline entre la gencive marginale et la papille inter-dentaire (D'après Csiszar et coll, 2007)



Figure 25 : Analyse histologique de la présence de Lumican entre la gencive marginale et la papille inter-dentaire (D'après Csiszar et coll, 2007)

Le TGF- β a montré deux types différents d'immuno-marquage dans la gencive marginale. Dans certaines zones, il y a une faible immuno-réactivité aux niveaux des cellules épithéliales basales puis une immuno-réactivité négative dans les autres couches de l'épithélium oral (A). Puis un phénomène similaire est observé au niveau de l'épithélium buccal de la papille inter-dentaire (C).

Figure 26a : Analyse histologique de la présence du marqueur TGF- β dans la gencive marginale (au niveau des cellules basales)

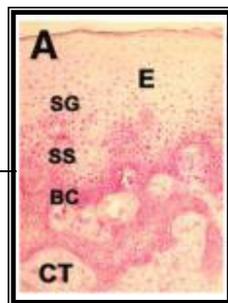


Figure 26b : Analyse histologique dans la papille (au niveau de l'épithélium) pour le marqueur TGF- β

Globalement l'intensité de l'immunomarquage semble plus forte dans la papille (F) que dans la gencive marginale (E) mais sans atteindre de différence statistiquement significative

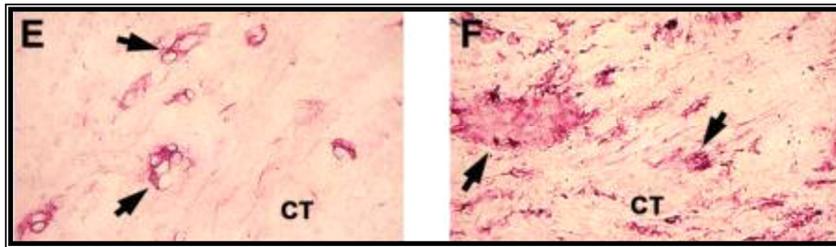


Figure 26c : Analyse histologique entre la gencive et la papille pour le marqueur TGF- β
 (Gencive) (Papille)
 (D'après Csiszar et coll, 2007)

CTGF présente une immuno-réactivité modérée au niveau des cellules basales de l'épithélium oral de la gencive marginale.

La différence avec la papille inter-dentaire se fait ici au niveau du stratum granulosum dans les cellules supra basales où l'immuno-marquage est négatif dans la gencive marginale et avec une expression forte dans la papille inter-dentaire (H).



Figure 27 : Analyse histologique de la papille (au niveau du stratum granulosum) pour le marqueur CTGF (D'après Csiszar et coll, 2007)

SOS-1 présente une immunoréactivité positive au niveau des cellules basales de la gencive marginale (M) et négative au niveau des cellules supra basales (O)

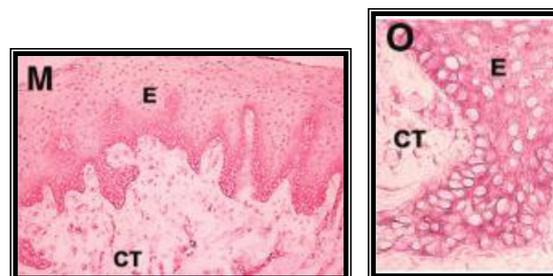


Figure 28a : Analyse histologique dans la gencive pour le marqueur SOS-1
 (D'après Csiszar et coll, 2007)

SOS-1 présente une plus forte intensité tout au long de l'épithélium oral de la papille inter-dentaire (N)

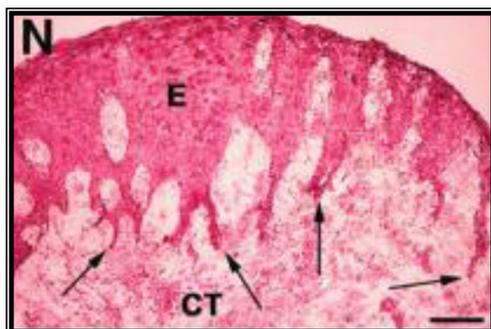


Figure 28b : Analyse histologique au niveau de la papille pour le marqueur SOS-1 (D'après Csiszar et coll, 2007)

Les autres marqueurs n'expriment aucune immuno-réactivité.

Notes: Légendes des photos:

- E : Epithélium oral
- BC : Cellules basales
- SS : Stratum spinosum
- SG: stratum granulosum
- SECT: tissu conjonctif subépithélial
- DCT : profondeur du tissu conjonctif

Table 1.
Comparison of Relative Immunostaining Intensity in the Oral Epithelium of the Marginal Gingiva and Interdental Papilla

Antibody	Marginal Gingiva			Interdental Papilla		
	SG	SS	BC	SG	SS	BC
CK19	0	0	0	1.0 ± 0.4	1.8 ± 0.2*	2.6 ± 0.2*
Integrin αvβ6	0	0	0	0.8 ± 0.3	1.6 ± 0.4†	2.6 ± 0.2*
Procollagen type I	0	0	0	0	0	0
Decorin	0	0	0	0	0	0
Biglycan	0	0.6 ± 0.2	2.0 ± 0.0	1.4 ± 0.2‡	1.8 ± 0.2‡	2.4 ± 0.2
Fibromodulin	0	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.2 ± 0.2	1.0 ± 0.4	2.4 ± 0.2‡
Lumican	0	1.2 ± 0.2	2.2 ± 0.4	1.8 ± 0.3‡	2.2 ± 0.4‡	3.0 ± 0.0‡
Fibronectin-EDA	0	0	0	0	0	0
Fibronectin-EDB	0	0	0	0	0	0
Tenascin-C	0	0	0	0	0	0
TGF-β	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.6	1.6 ± 0.4	2.2 ± 0.4
CTGF	0	0.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.3‡	1.4 ± 0.2	2.0 ± 0.0
SOS-1	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2	2.0 ± 0.0	1.2 ± 0.2‡	1.8 ± 0.2‡	2.8 ± 0.2‡

Figure 29 : Tableau de résultat comparant la présence des molécules dans la gencive marginale et la papille inter-dentaire au niveau de l'épithélium

SG : stratum granulosum ; SS : stratum spinosum ; BC : cellule basale

3.3 Résultats de l'analyse immuno-histochimique au niveau du tissu

conjonctif de la matrice extracellulaire

On peut observer des différences statistiques significatives dans l'expression des molécules du tissu conjonctif de la matrice extra cellulaire (Tableau 2) :

Le Pro-collagène de type 1 est exprimé plus fortement dans la profondeur du tissu conjonctif de la papille inter-dentaire ($p<0.05$).

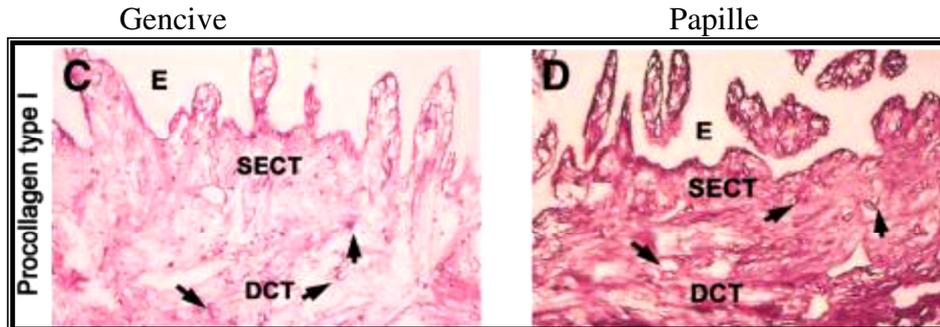


Figure 30 : Analyse histologique entre la gencive et la papille pour le marqueur Pro-collagène de type 1 (D'après Csiszar et coll, 2007)

La Decorine est présente aux mêmes endroits de la gencive marginale et de la papille inter-dentaire en proportions quasi équivalentes.

Le Biglycan est également associé à des fibres de collagènes et montre une immuno-réactivité supérieure au niveau de du tissu conjonctif de la papille inter-dentaire ($p<0.05$).

La Fibromoduline montre une coloration faible à modérée là où elle est proche des fibres de collagène.

Par contre, dans les couches plus profondes du tissu conjonctif de la papille inter-dentaire elle présente une forte immuno-réactivité sur les minces faisceaux de fibres de collagène.

Le Lumican est exprimé fortement dans les profondeurs du tissu conjonctif et faiblement au niveau de la papille inter-dentaire ($p<0.005$).

La Fibronectine A développe une immuno-réactivité faible à modérée au niveau de la membrane basale et dans la profondeur du tissu conjonctif de la gencive marginale. Par contre dans la papille inter-dentaire son expression est variable mais a été nettement plus forte dans l'ensemble de la matrice extracellulaire par rapport à la gencive marginale ($p<0.05$)

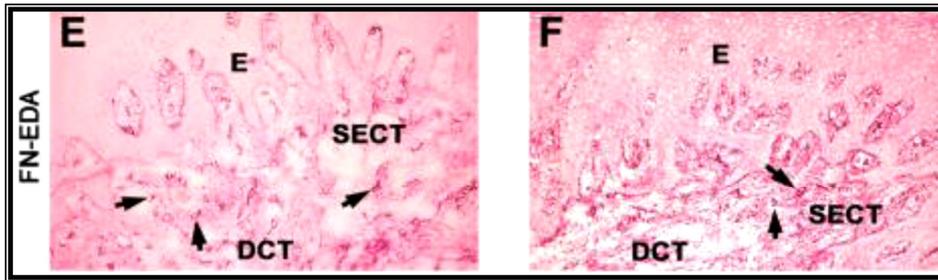


Figure 31 : Analyse histologique entre la gencive et la papille pour le marqueur Fibronectine A (D'après Csiszar et coll, 2007)

La Fibronectine B est absente ou faible dans la gencive marginale. Par contre elle est retrouvée dans la papille inter-dentaire au niveau de la membrane basale et dans les zones de la matrice extracellulaire (notamment sous-épithéliale) du tissu conjonctif ($p < 0.001$).

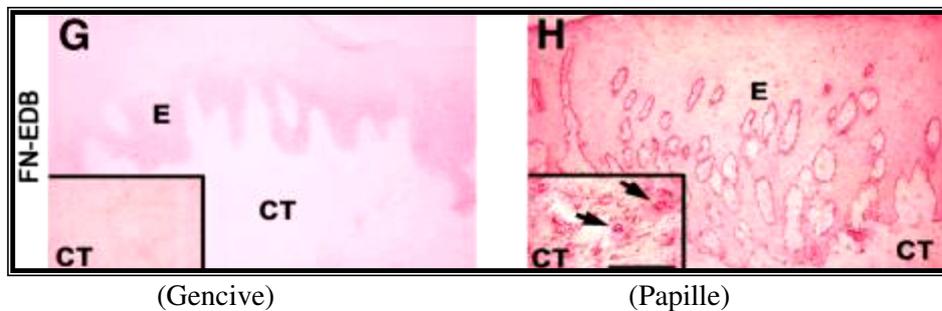


Figure 32 : Analyse histologique entre la gencive et la papille pour le marqueur Fibronectine B (D'après Csiszar et coll, 2007)

La Tenascine-C est fortement exprimée dans les zones localisées en profondeur du tissu conjonctif de la papille inter-dentaire (elle est associée avec des faisceaux de fibres de collagène) ($p < 0.001$).

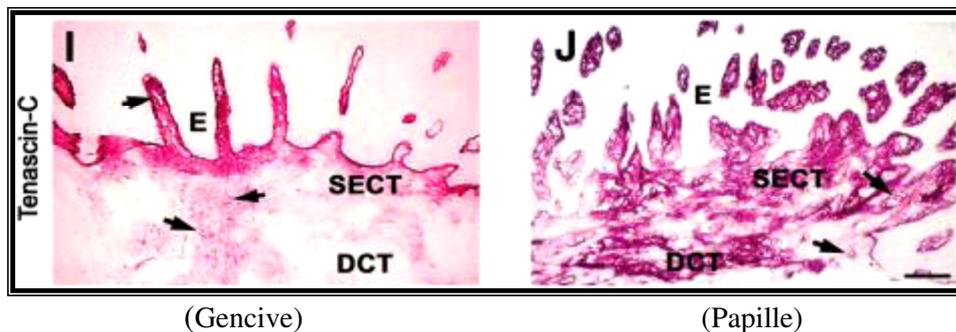


Figure 33 : Analyse histologique entre la gencive et la papille pour le marqueur Tenascin-C (D'après Csiszar et coll, 2007)

Notes : Légendes des photos

E : Epithélium oral
 BC : Cellules basales
 SS : Stratum spinosum
 SG: stratum granulosum
 SECT: tissu conjonctif subépithélial
 DCT : profondeur du tissu conjonctif

Table 2.
Comparison of Relative Immunostaining Intensity in the Connective Tissue Extracellular Matrix in the Marginal Gingiva and Interdental Papilla

Antibody	Marginal Gingiva			Interdental Papilla		
	BMZ	SECT	DCT	BMZ	SECT	DCT
Procollagen type I	2.0 ± 0.0	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.0 ± 0.2*
Decorin	0	3.0 ± 0.0	1.8 ± 0.2	0	2.8 ± 0.4	2.6 ± 0.2
Biglycan	0	1.0 ± 0.0	1.6 ± 0.2	0	1.4 ± 0.2	2.4 ± 0.2*
Fibromodulin	0.4 ± 0.4	1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.3	0.4 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.8 ± 0.2
Lumican	0	1.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0	0.8 ± 0.2 [†]	1.0 ± 0.0 [†]
Fibronectin-EDA	2.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.0 ± 0.3*	2.2 ± 0.2*
Fibronectin-EDB	0.4 ± 0.2	0	0	2.6 ± 0.2 [‡]	1.6 ± 0.2 [†]	2.0 ± 0.0 [‡]
Tenascin-C	3.0 ± 0.0	1.4 ± 0.2	0.2 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.0 ± 0.0	1.8 ± 0.2 [‡]

Figure 34 : Tableau de résultat comparant la présence des molécules dans la gencive marginale et la papille inter-dentaire au niveau de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif

BMZ : membrane basale ; SECT : tissu conjonctif sous épithélial ; DCT : profondeur du tissu conjonctif

3.4 Localisation des molécules-cible dans les cellules du tissu conjonctif

Plusieurs différences statistiques ont été constatées dans l'intensité de l'immuno-marquage des cellules du tissu conjonctif de la gencive marginale et celle de la papille inter-dentaire (Tableau 3) :

Le Pro-collagène de type 1 montre une intensité de coloration plus marquée dans les fibroblastes situés dans la papille inter-dentaire ($p < 0.05$).

Le Biglycan a montré une immuno-réactivité modérée dans les vaisseaux sanguins de la gencive marginale (plus faible dans les fibroblastes) mais elle est supérieure dans les vaisseaux sanguins de la papille inter-dentaire ($p < 0.05$).

La Fibromoduline et le Lumican ont montré une faible immuno-réactivité dans les fibroblastes et les vaisseaux sanguins dans la gencive marginale et dans la papille inter-dentaire.

TGF- β et CTGF présentent une immuno-réactivité supérieure, aussi bien dans les vaisseaux sanguins ($p < 0.05$) que dans les fibroblastes ($p < 0.005$), dans la papille inter-dentaire.

La Fibronectine A montre un fort immuno-marquage dans les vaisseaux sanguins de la gencive marginale et de la papille inter-dentaire.

La Fibronectine B présente un immuno-marquage négatif dans les fibroblastes de la gencive marginale alors qu'il est positif dans la papille inter-dentaire aussi bien dans les fibroblastes que dans les vaisseaux sanguins ($p < 0.001$).

La Tenascine-C est localisée dans les vaisseaux sanguins mais pas dans les fibroblastes tant au niveau de la gencive marginale que la papille inter-dentaire.

Table 3.
Relative Staining Intensity of Fibroblasts and Blood Vessels in the Marginal Gingiva and Interdental Papilla

Antibody	Marginal Gingiva		Interdental Papilla	
	FBL	BV	FBL	BV
Procollagen type I	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.8 \pm 0.2*	1.2 \pm 0.2
Decorin	0	0	0	0
Biglycan	1.0 \pm 0.0	1.8 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2*
Fibromodulin	0.8 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2
Lumican	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2
Fibronectin-EDA	1.0 \pm 0.0	3.0 \pm 0.0	1.8 \pm 0.2*	3.0 \pm 0.0
Fibronectin-EDB	0	0.4 \pm 0.2	1.0 \pm 0.0†	2.2 \pm 0.2†
Tenascin-C	0	3.0 \pm 0.0	0	2.8 \pm 0.2
TGF- β	0.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2‡	2.0 \pm 0.0*
CTGF	1.0 \pm 0.0	1.6 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2†	1.8 \pm 0.2
SOS-1	1.0 \pm 0.0	1.6 \pm 0.2	2.4 \pm 0.2‡	2.6 \pm 0.2*

Figure 35 : Tableau de résultat comparant la présence des molécules dans la gencive marginale et la papille inter-dentaire au niveau des fibroblastes et vaisseaux sanguins

FBL : Fibroblaste ; BV : Vaisseaux sanguins

3.5 Discussion

En conclusion, la papille inter-dentaire a une réponse biologique dépendante de ses caractéristiques moléculaires spécifiques et différente par rapport à l'ensemble de la gencive. Il y a des molécules qui ne sont normalement pas exprimées dans la gencive ($\alpha\beta 6$ Intégrin, Fibronectine B), des molécules impliquées dans la cicatrisation et la régénération des tissus ($\alpha\beta 6$ Intégrin, Fibronectine A et B, Tenascine-C, TGF β , CTGF) et des molécules qui jouent un rôle dans l'organisation et l'homéostasie de la matrice extra cellulaire (Pro collagène type 1, Decorin, Biglycan, Fibromoduline, Lumican).

Il y a aussi SOS-1 qui est une molécule intracellulaire qui régule la cascade de réactions de signalisation.

Des différences statistiques significatives ont été observées entre la gencive marginale et la papille inter-dentaire. Par exemple, la cytokératine 19 présente un marquage positif dans l'épithélium de la papille inter-dentaire alors qu'il est négatif dans la gencive marginale à l'exception de cellules isolées. Or les tests ont été réalisés sur des échantillons dépourvus de zones inflammatoires. Même s'il ne faut pas exclure la possibilité que les effets d'une inflammation bénigne dans un tissu affectent d'autres régions avoisinantes, CK19 est bien présent à l'état sain et reflète bien le phénotype de cet épithélium.

En règle générale on peut remarquer que les molécules impliquées dans la cicatrisation de la plaie sont toujours surexprimées dans la papille inter-dentaire par rapport à la gencive marginale et cela probablement due à la présence d'une légère inflammation localisée même dans les tissus "sains".

L'absence de régénération dans la gencive marginale peut dépendre de l'incapacité à récapituler les caractéristiques phénotypiques des cellules de la papille inter-dentaire.

Ainsi, les techniques chirurgicales qui permettent de préserver les papilles comme une source de cellules spécifiques conditionnent la régénération de la papille inter-dentaire.

Des thérapies moléculaires ciblées peuvent aussi être développés pour promouvoir la croissance et la différenciation des cellules appropriées

Sur la base des résultats et compte tenu de leurs expressions particulièrement puissantes CK19, Intégrine $\alpha\beta 6$ et la Fibronectine B, peuvent être utilisés comme marqueurs moléculaires pour les papilles inter-dentaires et de différenciation de la gencive marginale.