

**UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER**  
**FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE**

---

Année : 2018

Thèse n° : 2018 TOU3 3023

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Emilie JORDANA**

Le 22 mai 2018

**ETUDE CLINIQUE DE LA PREVALENCE D'ENTAMOEBAS GINGIVALIS,  
DE TRICHOMONAS TENAX ET DE LA FLORE ASSOCIEE DANS LES  
PARODONTITES**

Directeur de thèse : Dr Pierre Pascal POULET

**JURY**

|                              |                           |
|------------------------------|---------------------------|
| Président :                  | Professeur Philippe POMAR |
| 1 <sup>er</sup> assesseur :  | Pr Christine ROQUES       |
| 2 <sup>ème</sup> assesseur : | Dr Pierre Pascal POULET   |
| 3 <sup>ème</sup> assesseur : | Dr Sara LAURENCIN         |
| Membre invité du jury :      | Dr Loïc CALVO             |





## *Faculté de Chirurgie Dentaire*

### ➔ DIRECTION

#### DOYEN

Mr Philippe POMAR

#### ASSESEUR DU DOYEN

Mme Sabine JONJOT

#### CHARGÉS DE MISSION

Mr Karim NASR

Mme Emmanuelle NOIRRIT-ESCLASSAN

Mr Franck DIEMER

#### PRÉSIDENTE DU COMITÉ SCIENTIFIQUE

Mme Cathy NABET

#### RESPONSABLE ADMINISTRATIF

Mme Muriel VERDAGUER

### ➔ HONORARIAT

#### DOYENS HONORAIRES

Mr Jean LAGARRIGUE +

Mr Jean-Philippe LODTER +

Mr Gérard PALOUDIER

Mr Michel SIXOU

Mr Henri SOULET

### ➔ ÉMÉRITAT

Mr Damien DURAN

Mme Geneviève GRÉGOIRE

Mr Gérard PALOUDIER

### ➔ PERSONNEL ENSEIGNANT

## *Section CNU 56 : Développement, Croissance et Prévention*

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

#### ODONTOLOGIE PEDIATRIQUE

Professeurs d'Université : Mme BAILLEUL-FORESTIER, Mr. VAYSSE

Maîtres de Conférences : Mme NOIRRIT-ESCLASSAN, Mme VALERA, Mr. MARTY

Assistants : Mme DARIES, Mme BROUTIN

Adjoint d'Enseignement : Mr. DOMINE, Mme BROUTIN, Mme GUY-VERGER

#### ORTHOPEDIE DENTO-FACIALE

Maîtres de Conférences : Mr BARON, Mme LODTER, Mme MARCHAL, Mr. ROTENBERG,

Assistants : Mme YAN-VERGNES, Mme ARAGON

Adjoint d'Enseignement : Mme DIVOL,

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

Professeurs d'Université : Mr. SIXOU, Mme NABET, Mr. HAMEL

Maître de Conférences : Mr. VERGNES,

Assistant: Mr. ROSENZWEIG,

Adjoints d'Enseignement : Mr. DURAND, Mlle. BARON, Mr LAGARD

## *Section CNU 57 : Chirurgie Orale, Parodontologie, Biologie Orale*

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

#### PARODONTOLOGIE

Maîtres de Conférences : Mr. BARTHET, Mme DALICIEUX-LAURENCIN

Maître de Conférences Associée : Mme VINEL

Assistants: Mr. RIMBERT, Mr. ANDUZE-ACHER

Adjoints d'Enseignement : Mr. CALVO, Mr. LAFFORGUE, Mr. SANCIER, Mr. BARRE, Mme KADDECH

CHIRURGIE ORALE

Maîtres de Conférences : Mr. CAMPAN, Mr. COURTOIS, Mme COUSTY  
 Assistants : Mme COSTA-MENDES, Mr. BENAT  
 Assistante Associée : Mme GEORG,  
 Adjoints d'Enseignement : Mr. FAUXPOINT, Mr. L'HOMME, Mme LABADIE, Mr. RAYNALDI,

BIOLOGIE ORALE

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

**Section CNU 58 : Réhabilitation Orale****58.01 DENTISTERIE RESTAURATRICE, ENDODONTIE, PROTHESES, FONCTIONS-DYSFONCTIONS, IMAGERIE, BIOMATERIAUX (Mr ARMAND)**DENTISTERIE RESTAURATRICE, ENDODONTIE

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

PROTHÈSES

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

FONCTIONS-DYSFONCTIONS, IMAGERIE, BIOMATERIAUX

Maîtres de Conférences : Mme JONJOT, Mr. NASR, Mr. MONSARRAT  
 Assistants : Mr. CANCEILL, Mr. OSTROWSKI, Mr. DELRIEU  
 Adjoints d'Enseignement : Mr. AHMED, Mme MAGNE, Mr. VERGÉ, Mme BOUSQUET

-----  
 Mise à jour pour le 23 avril 2018

# REMERCIEMENTS

*Je dédie cette thèse,*

**À Benoît**, la personne la plus importante à mes yeux. Nous formons la plus belle équipe qui puisse exister et chaque jour passé avec toi me comble de bonheur. J'ai hâte d'être liée à toi par le mariage. Je t'aime.

**À mes parents**, pour le soutien que vous m'avez apporté pendant toutes ces années, pour l'éducation donnée, ainsi que les valeurs transmises, merci.

**À Loïc et Jonathan**, mes deux frères, que j'aime profondément. Chaque moment passé ensemble est très précieux à mes yeux. On se soutiendra toujours tous les trois et garderons toujours cette complicité qui nous unit.

**À ma famille** (Léopold, Franck, Lou, Luc, Mamie Henriette, Papy Claude, Mamie Lilie, Papy Jean-Claude), qui est pour moi une famille extraordinaire, chaque moment passé avec chacun de vous me remplit de bonheur.

**À mes futurs beaux-parents**, je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi. J'ai une immense chance de vous avoir en tant que beaux-parents.

**À Audrey et Thomas**, ma future belle-sœur et son fiancé, je vous remercie pour l'aide que vous avez apporté à cette thèse. Nous sommes très proches tous les quatre et j'espère de tout cœur que ça le restera.

**À Déborah**, ma binôme et amie, pour toutes ces années d'étude passées ensemble et tous ces bon moments partagés.

**À Alexis et Delphine**, un grand merci pour la contribution essentielle que vous avez apporté à cette thèse.

**À Monsieur le Professeur ADOUE Daniel**, grâce à qui cette thèse a pu voir le jour. J'ai un grand respect pour vous et je vous remercie du fond du cœur.

**À tous ceux qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail et qui me font l'honneur d'assister à la soutenance de cette thèse**

À notre Président du Jury,

Monsieur Le Professeur POMAR Philippe

- Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse,
- Professeur des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie,
- Lauréat de l'Institut de Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale de la Salpêtrière,
- Habilitation à Diriger des Recherches (H.D.R.),
- Officier dans l'Ordre des Palmes Académiques

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Vous nous avez transmis tout au long de ces études vos nombreuses connaissances et votre rigueur dans le travail. Nous avons apprécié votre enseignement et votre gentillesse. Vous avez su apporter un grand soutien durant ces dernières années particulièrement difficiles. Veuillez trouver, ici, le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A notre Jury,

Madame Le Professeur ROQUES Christine,

- Professeur des universités

- Praticien hospitalier

Nous sommes très touchés par l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Votre présence est importante. Nous tenons à vous remercier chaleureusement pour votre accompagnement toujours bienveillant durant cette étude, qui n'aurait pas pu être réalisée sans vous. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de notre profonde reconnaissance ainsi que notre plus grand respect.

A notre Directeur de Thèse,

Monsieur Le Docteur POULET Pierre-Pascal

- Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie,
- Docteur en Chirurgie Dentaire,
- Docteur de l'Université Paul Sabatier,
- Lauréat de l'Université Paul Sabatier.

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié ce travail. Je vous remercie également d'y avoir apporté votre expérience, vos compétences et votre disponibilité. C'est pour moi un immense honneur d'avoir travaillé sur ce sujet passionnant, que le Dr Laurencin et vous-même, avez eu la gentillesse de me proposer. Je vous prie de trouver ici toute ma gratitude et mon respect le plus profond.

A notre Jury,

Madame Le Docteur LAURENCIN-DALICIEUX Sara

- Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie,
- Docteur en Chirurgie Dentaire,
- Docteur de l'Université Paul Sabatier,
- Diplôme Universitaire de Parodontologie
- Lauréate de l'université Paul Sabatier

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en ayant aimablement accepté de siéger à notre jury de thèse. Nous avons pu apprécier la richesse de votre enseignement clinique et vos qualités humaines et professionnelles. Nous vous remercions sincèrement pour toute l'aide que vous nous avez apporté durant cette étude. Soyez assurée de notre gratitude et de notre profond respect.

A notre Jury,

Monsieur Le Docteur CALVO Loïc

- Adjoint d'Enseignement à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse,
- Ex-Assistant hospitalo-universitaire d'Odontologie,
- Docteur en Chirurgie Dentaire,
- Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales,
- D.E.A. spécialité : Anthropologie sociale et historique de l'Europe,
- Certificat d'Etudes Supérieures de Chirurgie Dentaire Parodontologie,
- Lauréat de l'Université Paul Sabatier

C'est un grand plaisir de vous compter parmi les membres du jury. Je tiens à vous témoigner ma sincère gratitude pour toute l'aide que vous m'avez apportée et le temps que vous m'avez consacré pour la réalisation de cette étude. Je vous remercie sincèrement. Veuillez trouver par ces quelques mots l'expression de mon profond respect.

# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>PARTIE 1 : ETIOLOGIE DES MALADIES PARODONTALES : ASPECTS MICROBIOLOGIQUES....</b> | <b>16</b> |
| 1. Etiologie bactérienne .....   | 17        |
| 1.1. Caractéristiques des bactéries .....  | 17        |
| 1.1.1. Paroi.....  | 17        |
| 1.1.2. Membrane plasmique et éléments intra-cytoplasmiques .....                     | 19        |
| 1.1.3. Eléments inconstants.....   | 19        |
| 1.2. Classification des bactéries.....   | 20        |
| 1.2.1. Forme .....   | 20        |
| 1.2.2. Coloration de Gram.....   | 20        |
| 1.2.3. Mode respiratoire .....   | 20        |
| 1.3. Critères de pathogénicité .....   | 21        |
| 1.4. Bactéries parodonto-pathogènes.....   | 22        |
| 1.4.1. <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....   | 22        |
| 1.4.2. <i>Tannerella forsythia</i> .....   | 26        |
| 1.4.3. <i>Tremonema denticola</i> .....  | 29        |
| 1.4.4. <i>Prevotella intermedia</i> .....  | 31        |
| 1.4.5. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> .....                             | 32        |
| 1.4.6. <i>Fusobacterium</i> .....  | 33        |
| 1.4.7. <i>Campylobacter</i> .....  | 35        |
| 1.4.8. <i>Peptostreptococcus micro</i> .....   | 35        |
| 1.4.9. <i>Eikenella corrodens</i> .....  | 36        |
| 1.5. Interactions bactériennes.....  | 36        |
| 1.6. Complexes bactériens.....   | 38        |
| 2. Etiologie virale.....   | 41        |
| 3. Etiologie parasitaire.....  | 42        |
| 3.1. <i>Entamoeba gingivalis</i> .....   | 42        |

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| 3.1.1.                                 | Morphologie.....  | 42        |
| 3.1.2.                                 | Potentielle pathogénicité.....  | 43        |
| 3.2.                                   | Trichomonas tenax .....   | 45        |
| 3.2.1.                                 | Morphologie.....  | 45        |
| 3.2.2.                                 | Potentielle pathogénicité.....  | 46        |
| 3.3.                                   | Synthèse bibliographique de la prévalence des parasites dans la cavité buccale ....   | 46        |
| 4.                                     | Un point sur les défenses de l'hôte.....  | 56        |
| <b>PARTIE 2 : ETUDE CLINIQUE .....</b> |   | <b>57</b> |
| 1.                                     | Matériel et méthodes .....  | 58        |
| 1.1.                                   | Objectifs de l'étude .....  | 58        |
| 1.2.                                   | Critères d'évaluation .....   | 58        |
| 1.3.                                   | Population étudiée .....  | 59        |
| 1.3.1.                                 | Critères d'inclusion .....  | 59        |
| 1.3.2.                                 | Critères de non inclusion .....   | 59        |
| 1.4.                                   | Protocole de prélèvement.....   | 59        |
| 1.5.                                   | Transport et conservation des échantillons .....  | 60        |
| 1.6.                                   | Cultures des bactéries .....  | 60        |
| 1.6.1.                                 | Mise en culture .....   | 60        |
| 1.6.2.                                 | Description morphologique et comptage des différentes colonies observées après culture en milieu riche en CO <sub>2</sub> ou anaérobie, suivant la dilution. .... | 62        |
| 1.6.3.                                 | Repiquage .....   | 63        |
| 1.6.4.                                 | Coloration de Gram.....   | 64        |
| 1.6.5.                                 | Observation au microscope des quatre lames (A1, A2, C1, C2) .....   | 65        |
| 1.6.6.                                 | Comparaison des géloses après repiquage des colonies.....   | 65        |
| 1.6.7.                                 | Repiquage sur gélose des bactéries à identifier .....   | 66        |
| 1.7.                                   | Identification des bactéries .....  | 66        |
| 1.7.1.                                 | Test Rapid ID 32 A .....  | 66        |
| 1.7.2.                                 | Spectrométrie de masse .....  | 67        |
| 1.8.                                   | Fiches à remplir pendant toute la durée du protocole d'identification des bactéries pour chaque patient.....  | 70        |
| 1.9.                                   | Identification d'Entamoeba Gingivalis et Trichomonas Tenax : Réaction en chaîne par polymérase.....   | 74        |
| 1.9.1.                                 | Extraction d'ADN.....   | 74        |

|                         |  |           |
|-------------------------|--|-----------|
| 1.9.2.                  | Amplification de l'ADN : PCR conventionnelle ..... | 75        |
| 1.9.3.                  | Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose .....       | 79        |
| 2.                      | Résultats .....                                    | 82        |
| 3.                      | Discussion .....                                   | 92        |
| <b>CONCLUSION</b>       | .....  | <b>95</b> |
| Table des illustrations | .....  | 97        |
| Bibliographie           | .....  | 99        |

# INTRODUCTION

Nous savons aujourd'hui que les parodontites sont des atteintes infectieuses à composante inflammatoire provoquant la destruction des tissus de soutien de la dent. Elles se manifestent par des saignements, une halitose, des mobilités, des migrations dentaires et des abcès.

Elles touchent 50% de la population et sont en étroite relation avec d'autres pathologies systémiques comme les maladies cardio-vasculaires, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde, le VIH, ou l'accouchement prématuré.

On distingue plusieurs types de maladies parodontales : les gingivites (inflammatoire, médicamenteuse, gravidique, ulcéro-nécrotique), les parodontites chroniques localisées ou généralisées, les parodontites agressives localisées ou généralisées, les parodontites pré-pubertaires et les parodontites ulcéro-nécrotiques.

Certains facteurs augmentent significativement le risque parodontal : l'âge, le sexe, les conditions socio-économiques, le stress, le tabac, les déficiences immunitaires et la résistance à la carie.

La parodontite est une pathologie multifactorielle complexe qui résulte d'un déséquilibre entre une infestation microbienne et une réponse immuno-inflammatoire de l'hôte.

Quatre conditions sont à réunir pour déclencher une parodontite :

- Présence de bactéries virulentes
- Absence de bactéries protectrices rentrant en compétition avec les bactéries pathogènes
- Défaut du système immunitaire de l'hôte
- Environnement local compatible avec la croissance des bactéries pathogènes.

L'implication bactérienne dans l'étiopathogénie des maladies parodontales n'est plus à prouver. Cependant, la présence de bactéries parodonto-pathogènes est nécessaire mais non suffisante pour développer une parodontite, ce qui nous amène à penser que d'autres microorganismes joueraient un rôle dans l'étiologie.

Ainsi, à côté de l'étiologie bactérienne, une prévalence parasitaire et virale a été explorée par certains auteurs. Ils se sont concentrés sur l'étude de deux parasites retrouvés dans la cavité buccale : *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax*.

Les connaissances sur la parodonto-pathogénicité parasitaire restent tout de même très floues et limitées à l'heure actuelle. Selon certains, *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas*

*Tenax* ne seraient que des parasites commensaux. D'autres, en revanche, seraient en faveur d'un rôle dans l'installation ou la progression des parodontites.

Une meilleure compréhension du rôle de ces parasites dans les parodontites permettrait peut-être de mieux appréhender l'étiopathogénie parodontale et de proposer un traitement plus adapté en conséquence. En effet, connaître l'étiologie et le mécanisme pathogénique d'une maladie permet d'avoir une meilleure prise en charge thérapeutique avec des traitements plus ciblés.

Nous allons dans la première partie nous intéresser à l'étiologie parodontale sous un aspect microbiologique, puis dans la deuxième partie nous présenterons l'étude faisant l'objet de cette thèse.

PARTIE 1

ETIOLOGIE DES MALADIES  
PARODONTALES : ASPECTS  
MICROBIOLOGIQUES

## 1. Etiologie bactérienne

### 1.1. Caractéristiques des bactéries

Les bactéries sont des organismes procaryotes unicellulaires de 1 à 10 µm.

#### 1.1.1. Paroi

La paroi bactérienne est une structure rigide qui permet de protéger la bactérie de la forte pression osmotique au sein du cytoplasme et possède un pouvoir antigénique. Elle représente 30% du poids de la bactérie.

Elle est composée essentiellement de peptidoglycane, hétéro-polymère constitué de chaînes glucidiques reliées entre elles par des liaisons peptidiques.

On distingue deux types de paroi, selon la coloration de Gram que l'on abordera plus loin :

#### - Paroi des bactéries Gram + :

Elle est composée à 90% de peptidoglycane avec de nombreuses liaisons glucidiques. On retrouve également des acides teichoïques qui peuvent parfois dépasser la paroi, et des acides lipoteichoïques qui sont connectés aux lipides de la membrane plasmique.

#### - Paroi des bactéries Gram - :

Le peptidoglycane représente moins de 20% du poids de la bactérie. La paroi est divisée en deux structures : la membrane externe et l'espace périplasmique.

La membrane externe est une bicouche phospholipidique. Elle possède des porines permettant le transport des molécules hydrophiles (comme les antibiotiques), des protéines permettant le transport des facteurs de croissance et du fer, et des protéines de structure.

Au sein de cette membrane externe se trouve le Lipopolysaccharide Acide (LPS), une endotoxine qui se situe parmi les phospholipides. Il est constitué d'un polysaccharide distal hydrophile appelé O-antigène situé en extra cellulaire, d'un oligosaccharide "noyau" et d'un domaine hydrophobe appelé « lipide A » implanté dans la membrane. Celui-ci est la partie active et reconnue par le système immunitaire.

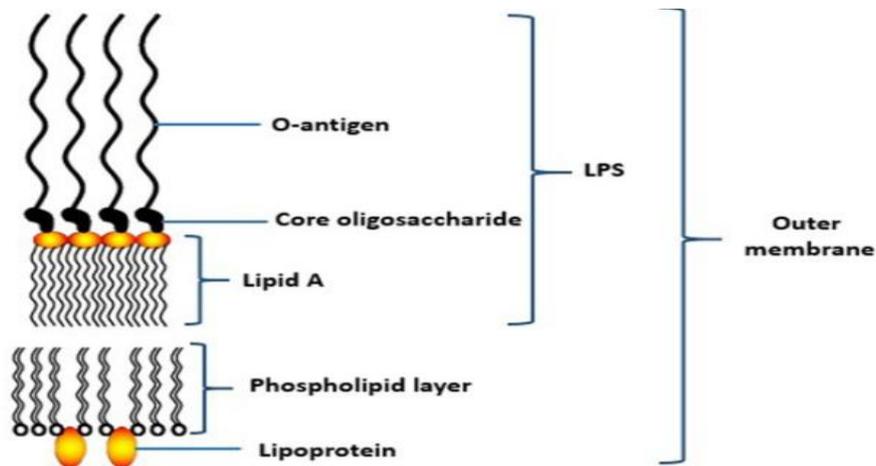


Figure 1: Structure du Lipopolysaccharide Acide

Il est responsable de l'activation de la réponse inflammatoire de l'hôte en provoquant l'augmentation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, et bloque l'ostéogénèse.

En effet, il est reconnu par le complexe de récepteurs TLR4-CD14, exprimé par les lymphocytes, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Il provoque alors une cascade de réactions enzymatiques, qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires : TNF  $\alpha$ , interleukine-1 $\beta$ , interleukine-6, interleukine 8, prostaglandines, PAF 1 (facteur d'activation plaquettaire). (1)

Il inhibe également la E-selectine qui est exprimée à la surface des cellules endothéliales, bloquant ainsi l'adhérence des leucocytes sur les cellules endothéliales.(2)

De plus, le LPS induit une autophagie mitochondriale des fibroblastes.(3)

### 1.1.2. Membrane plasmique et éléments intra-cytoplasmiques

La membrane plasmique est composée de protéines entourée d'une bicouche phospholipidique. Elle a un rôle d'échange de métabolites grâce aux perméases et de production d'ATP. Elle sert également de fixation aux flagelles.

Dans le cytoplasme, nous trouvons :

- Ribosomes divisés en deux sous unités, il contient l'ARN ribosomal et des protéines ribosomales, il a un rôle dans la synthèse des protéines
- Appareil nucléaire (nucléoïde)
- Réserves organiques, propres à chaque groupe bactérien.

### 1.1.3. Éléments inconstants

- Flagelles :

Ils ont un rôle dans la mobilité, le chimiotactisme et d'antigénicité permettant l'identification de la bactérie.

- Fimbriae :

Il s'agit d'une excroissance filamenteuse localisée au niveau de la membrane externe de certaines bactéries Gram négatives. Il joue un rôle dans l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales de l'hôte et dans la virulence de certaines bactéries.

- Capsule

La capsule est une structure polysaccharidique entourant la paroi des bactéries Gram négatives. Elle empêche la phagocytose des bactéries, et favorise l'adhésion.

- Glycocalyx

Il s'agit d'une enveloppe polysaccharidique à la surface de la bactérie qui favorise son adhésion aux cellules de l'hôte et qui la rend résistante aux antiseptiques et antibiotiques.

- Spores

Certaines bactéries, comme les Bacilles, peuvent former des endo-spores lorsque l'environnement devient pauvre en éléments nutritifs. Ce sont des formes inactives et non pathogènes de la bactérie hautement résistantes aux variations de températures et aux agents chimiques, comme les antiseptiques ou antibiotiques. Cependant, lorsque l'environnement devient à nouveau favorable, ces spores redonnent naissance à des bactéries identiques.

## 1.2. Classification des bactéries

En microbiologie médicale, les principales classifications sont :

### 1.2.1. Forme

- Cocci (sphérique) pouvant être en chaîne ou en amas
- Bacille (forme allongée en bâtonnet)
- Coccobacille (ovale)
- Filamenteuse
- Spirillée
- Vibrion (incurvée)

### 1.2.2. Coloration de Gram

Cette coloration a été mise au point par Hans Christian Gram en 1884. Elle permet de distinguer les deux types de parois bactériennes, celles-ci ayant une grande influence sur le pouvoir infectieux et la sensibilité aux antibiotiques des bactéries.

Les bactéries Gram positives résistent à la décoloration du violet de Gentiane par l'alcool et donc apparaissent violettes au microscope.

En revanche, les bactéries Gram négatives, par la haute teneur en lipide de leur paroi, laissent passer l'alcool et sont donc décolorées. Elles apparaissent rose pâle après recoloration à la safranine.

### 1.2.3. Mode respiratoire

- Aérobic strict : ne peut vivre qu'en présence d'oxygène
- Micro-aérophile : croissance optimale dans un milieu où la concentration en oxygène est inférieure à la concentration atmosphérique
- Capnophile : croissance optimale dans un milieu enrichi en CO<sub>2</sub>.
- Facultatif : peut utiliser les différents modes respiratoires
- Anaérobic strict : ne peut vivre qu'en l'absence d'oxygène.

### 1.3. Critères de pathogénicité

Les pathologies infectieuses mono-microbiennes s'expliquent en principe selon les postulats de Koch. Les parodontites, en revanche, sont des infections poly-microbiennes où rentrent en jeu une vingtaine de bactéries, ainsi que des agents infectieux non bactériens.

Socransky a donc révisé ces critères afin qu'ils correspondent au modèle infectieux de la maladie parodontale.

#### Postulat n°1 : ASSOCIATION :

L'agent étiologique doit être présent au niveau des sites malades, et absent ou présent en moindre proportion dans les sites sains.

#### Postulat n°2 : ELIMINATION :

L'élimination de l'agent pathogène entraîne une rémission des signes cliniques.

#### Postulat n°3 : REPONSE IMMUNITAIRE DE L'HOTE

L'agent pathogène entraîne une réponse immunitaire de l'hôte.

#### Postulat n°4 : PATHOGENICITE CHEZ L'ANIMAL :

L'agent pathogène est capable d'induire des lésions chez l'animal.

#### Postulat n°5 : MECANISME DE PATHOGENICITE

L'agent pathogène doit pouvoir se multiplier, envahir l'hôte, et/ou produire des facteurs de virulence ayant un rôle dans l'adhérence, la croissance/multiplication, le contournement des défenses de l'hôte et la destruction tissulaire.

*Figure 2 : Postulats de Koch révisés par Socransky, 1992 (4)*

Les bactéries doivent répondre à ces cinq critères pour être considérées comme parodonto-pathogènes.

#### 1.4. Bactéries parodonto-pathogènes

Nous allons aborder dans ce chapitre les principales bactéries parodonto -pathogènes retrouvées dans les poches parodontales.

##### 1.4.1. *Porphyromonas gingivalis*

Cette bactérie est l'agent pathogène majeur des parodontites, tant par sa prévalence élevée dans les poches parodontale (85.75 %), que par les facteurs de virulences qu'elle possède. (4)

C'est un bacille Gram négatif, assacharolytique et non mobile. La pigmentation est noire après 6 à 10 jours d'incubation sur une gélose au sang, ceci étant dû à l'agrégation de l'hème à la surface cellulaire. Elle mesure 0,5-0,8 x 1,0-3,5 µm. Elle est anaérobie stricte mais peut supporter un certain taux d'oxygène, grâce à la capacité de sa superoxyde dismutase à éliminer les molécules d'oxygène libérées par les polynucléaires neutrophiles.(5)

A la lumière ultraviolette, elle ne devient pas fluorescente, contrairement à *Prevotella Intermedia*. Elle est identifiable grâce à la non fermentation des sucres, à l'agglutination des érythrocytes, à l'absence de production de catalase et à la positivité au test BANA (présence d'une enzyme pseudo-trypsine qui hydrolyse le substrat benzoyl-DL-arginine-β-naphtyl-amine).(6)

Sa survie dans les poches parodontales est possible grâce à la fermentation d'acides aminés. Le fer est également un élément indispensable à sa croissance.

Nous la retrouvons rarement dans les parodonties juvéniles localisées mais très fréquemment dans les parodontites généralisées.



Figure 3 : Colonie de *Porphyromonas Gingivalis* à pigmentation noire sur gélose au sang

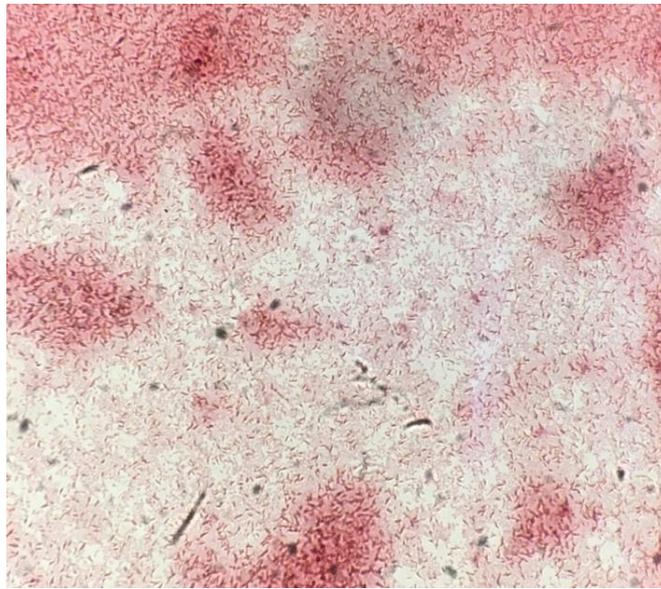


Figure 4 : *Porphyromonas Gingivalis* observé sous microscope optique grossissement x100

#### Facteurs de virulence de *Porphyromonas gingivalis*

Le pouvoir pathogène d'une bactérie dépend de sa capacité à produire des facteurs de virulence contre l'hôte. Ces facteurs peuvent concerner l'adhésion de la cellule bactérienne aux autres bactéries et aux cellules de l'hôte, la multiplication et la croissance de la bactérie, la destruction tissulaire directe et indirecte, et le contournement du système immunitaire de l'hôte.

- Fimbriae

Le fimbriae possède des adhésines permettant l'adhérence de la bactérie aux molécules salivaires (protéines et glycoprotéines riches en proline), aux cellules épithéliales, au fibrinogène, à la fibronectine, à la lactoferrine, et aux autres bactéries.(7)

Le fimbriae joue également un rôle dans la réponse inflammatoire. En effet il favorise la production de  $TNF\alpha$ , IL  $1\beta$ , IL 6 et IL 8 par les monocytes, grâce à une stimulation de la protéine Toll Like et du complément CD14. De plus, il inhibe la production d'IL 12 et d'IFN $\gamma$ , ce qui diminue l'activité bactéricide des macrophages.

Il existe deux types de fimbriae à la surface de *Porphyromonas Gingivalis* selon l'expression protéinique à sa surface cellulaire : le premier possède une sous unité protéinique appelée FimA (ou fimbrilline), codé par le gène fimA, aussi appelé fimbriae long. Le second, moins étudié, est appelé fimbriae court. Il possède une sous unité protéinique appelé mfa1 codée par le gène mfa1. Ces deux types ont une antigénicité distincte.

Il existe 6 types de long fimbriae selon des variations nucléotidiques: de I à V et Ib, le génotype II étant le plus virulent (plus grande capacité d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales) et le I le moins virulent.

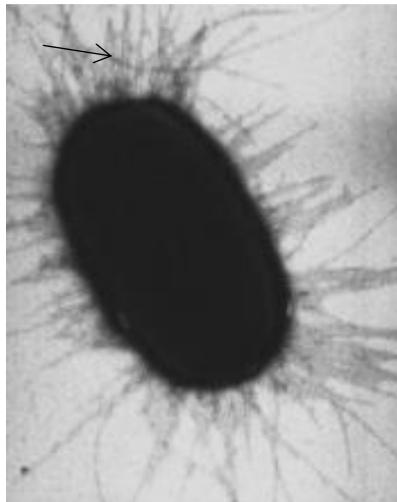


Figure 5 : Fimbriae sous microscope à contraste de phase, La flèche montre les fimbriae, appendices filamenteux sur la surface de la membrane externe.

- Capsule

Une souche de *Porphyromonas Gingivalis* non encapsulée a un taux de phagocytose par les macrophages 4,5 fois plus élevé que la souche encapsulée. (8)

*Porphyromonas Gingivalis* encapsulée peut moduler l'expression des cytokines.

Elle participe à la coaggrégation avec *Fusobacterium Nucleatum*.

- Protéinases

Les protéinases les plus importantes sont les gingipaïnes. Elles font parties de la famille des cystéines protéinases. Elles clivent des substrats de protéine et de peptide après des résidus d'arginine (gingipaïne R avec deux types, RgpA et RgpB) et de lysine (gingipaïne K). Elles représentent 85% de l'activité protéolytique extracellulaire de *Porphyromonas gingivalis*.

Elles dégradent les composants de la matrice extra cellulaire, le fibrinogène, les immunoglobulines, les cytokines et l'hémoglobine, cette dernière propriété permettant d'apporter les éléments de croissance à la bactérie.

Elles dégradent également les  $\alpha$ -défensines dérivées des neutrophiles, les facteurs du complément tels que C3 et C4, les récepteurs des lymphocytes T tels que CD2, CD4 et CD8. Elles inhibent donc l'activité bactéricide de l'hôte.

La gingipaïne R possède quatre domaines hémagglutinine/adhésine ce qui lui confère des propriétés d'adhésion aux cellules épithéliales et aux fibroblastes.(9)

Une étude récente a montré que les gingipaïnes étaient responsables d'une production diminuée de CD14 par les macrophages.(10)

D'autres protéinases jouent un rôle dans la virulence de la bactérie.

C'est le cas de l'hémolysine (gingivaïne), une cystéine protéinase qui lyse les érythrocytes et permet donc la libération de fer nécessaire à la bactérie, et de l'X propyl Dipeptidyl peptidase qui permet d'apporter les acides aminés essentiels à sa survie.

- Lipopolysaccharide

Nous avons vu précédemment que le LPS était capable d'activer le système immunitaire de l'hôte en provoquant l'augmentation de cytokines pro-inflammatoire. Il est aussi capable bloquer l'ostéogénèse et donc d'empêcher la régénération du parodonte.

- Vésicules

Toutes les souches de *Porphyromonas gingivalis* possèdent des vésicules provenant de la membrane externe. Elles ont été découvertes en 1985 par William GD. Ces vésicules ont des propriétés similaires à leur bactérie parente car elles possèdent tous les facteurs de virulence de la bactérie. Elles permettent d'étendre la pathogénicité bactérienne vers des zones plus éloignées. Elles mesurent environ 50 nm.

Elles interagissent avec la Chlorhexidine, fonctionnant comme un leurre et protègent la bactérie de l'antiseptique. (11)

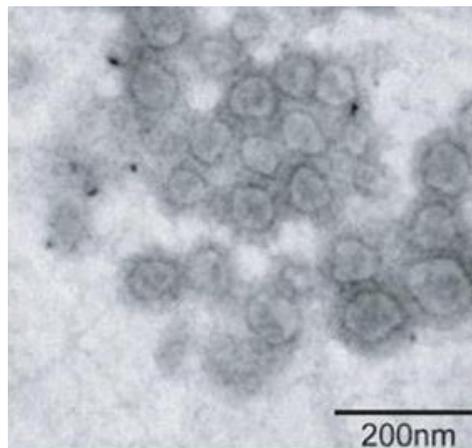


Figure 6 : Vésicules de *Porphyromonas Gingivalis* au microscope électronique à transmission. (11)

Enfin, *Porphyromonas Gingivalis* est capable de s'intérioriser dans les cellules hôtes et de survivre en bloquant l'apoptose et en provoquant l'autophagie des protéines de celle-ci. Le mécanisme d'intériorisation est cependant encore flou à l'heure actuelle.

1.4.2. *Tannerella forsythia*

*Tannerella Forsythia* a été décrite pour la première fois en 1986 par Tanner et al. sous le nom de Bacteroide forsythus.(12)

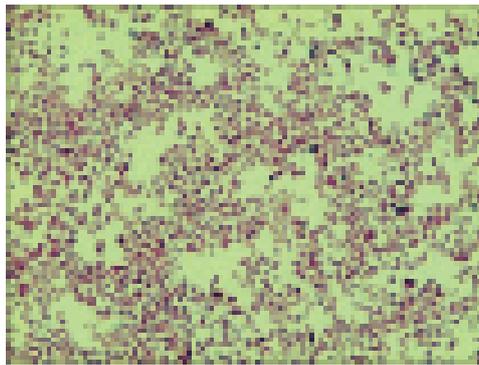
C'est une bactérie à Gram négatif anaérobie stricte asacharolytique faisant partie de la famille des bactéroïdes. Elle se nourrit de peptides et d'acides aminés. Elle est positive au test BANA (possède une enzyme pseudo trypsine).

Elle répond à tous les critères de Socransky. Elle est retrouvée en plus grande quantité dans les sites atteints de gingivite et de parodontite chronique ou agressive.

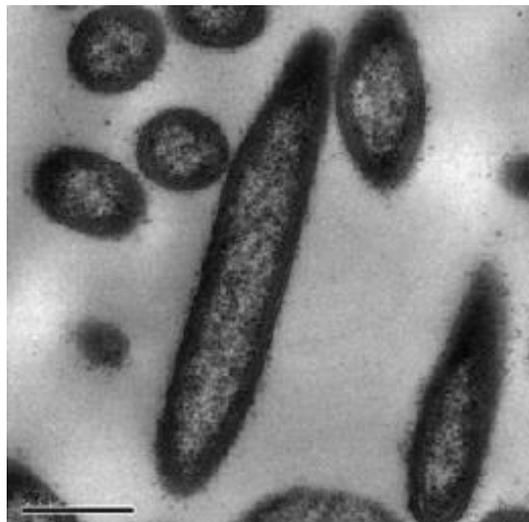
C'est une bactérie peu étudiée en raison de sa difficulté de culture.



*Figure 7 : Tannerella forsythia sur gélose au sang (13)*



*Figure 8 : Coloration au Gram de Tannerella Forsythia*



*Figure 9 : Tannerella forsythia au microscope électronique(14)*

### Facteurs de virulence :

- Trypsin like protéine

C'est une enzyme clivant des protéines et permettant ainsi la croissance de la bactérie.(13)

- Glycosidases

Elles sont capables d'hydrolyser des oligosaccharides et des protéoglycanes, ce qui provoque une destruction du parodonte et un apport de nutriments essentiels à la survie de *Tannerella Forsythia*.(14)

- Composant de la couche S

La couche S est une couche superficielle composée de deux glycoprotéines. D'après les études, elle favorise l'adhérence de la bactérie, induit une réponse immunitaire, a une activité hémagglutinine et provoque des abcès chez la souris. Elle joue également un rôle important dans la coaggrégation bactérienne. (15,16)

- BSpA protéine riche en leucine

Cette protéine joue un rôle dans les interactions inter-bactériennes et dans la libération des cytokines pro-inflammatoires par l'intermédiaire de la voie TLR-2.(17)

- Lipoprotéines de surface

Ces lipoprotéines provoquent la libération des cytokines pro-inflammatoires et l'apoptose des fibroblastes, des cellules épithéliales et des monocytes.(18)

- PrtH protéase

C'est une enzyme qui permet le détachement de la bactérie du substrat, et qui augmente la production d'IL-8. Des études ont montré une corrélation entre le taux élevé de PrtH et l'importance de la perte d'attache.(19)

### 1.4.3. *Treponema denticola*

*Treponema denticola* est une bactérie Gram négative anaérobie, qui fait partie de la famille des spirochètes. Elle fait partie des huit espèces de *Treponema* retrouvées dans la cavité orale.

Elle a une forme spiralée et mesure 5-20  $\mu\text{m}$  x 0,1-0,5  $\mu\text{m}$ .

Sa motilité se fait grâce à quatre endo-flagelles formés de deux faisceaux qui se localisent dans l'espace péri plasmique, entre la membrane interne et externe, et qui s'étendent sur les deux tiers de la cellule.

Elle joue un rôle important principalement dans la gingivite ulcéro-nécrotique, les péri coronarites aiguës et la parodontite chronique.

Elle se localise dans les poches parodontales profondes et est très fréquemment associée à *Porphyromonas gingivalis* et *Tannerella forsythia*. En effet, elle peut transporter ces deux autres bactéries du complexe rouge grâce à sa motilité : c'est le phénomène du « piggy back ».

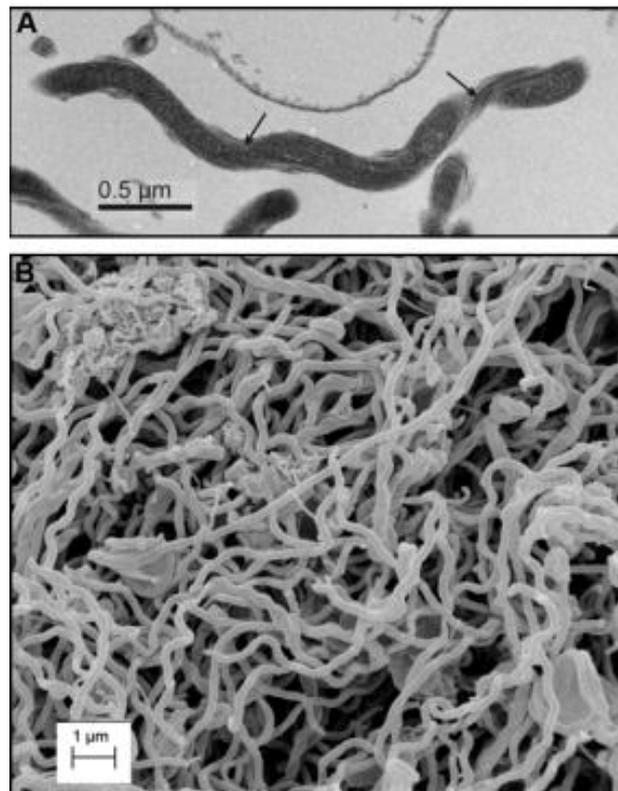


Figure 10 : (A) *Treponema denticola* sur microscope électronique à transmission. Les flèches montrent les faisceaux d'endo-flagelles.

Figure 11 : (B) Micrographies électronique *Treponema denticola*

### Facteurs de virulence :

- Protéines participant à l'adhérence

Nous retrouvons la Leucin Rich Repeat Protein (Lrra), la Major Outer Sheath protein (Msp) et l'Ortholog of oligopeptide transporter unit (OppA).

Ce sont des adhésines permettant l'adhésion de la bactérie à la matrice extracellulaire de l'hôte et aux cellules épithéliales.

La Lrra interagit avec la Leucin Rich Repeat Protein (BspA) de *Tannerella Forsythia*, coaggrégant ainsi avec elle. (20)

La Msp est une protéine qui se lie à la fibronectine et à la laminine afin d'adhérer aux fibroblastes. Elle se localise principalement dans l'espace périplasmique.

Elle active également le système immunitaire par le biais de la voie TLR2 et perturbe le cytosquelette des fibroblastes.

L'OppA participe à l'adhésion de la bactérie mais n'est pas nécessaire à la liaison de celle-ci aux cellules de l'hôte.

- Dentilisine

C'est une protéase capable de dégrader les immunoglobulines, certains récepteurs membranaires, les protéines du complément et les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8).

Elle dégraderait les protéines d'agrégation intercellulaires épithéliales et permettrait ainsi la pénétration de *Treponema Denticola* à travers la barrière épithéliale. (21)

Elle s'associe avec la protéase chymotrypsin-like pour dégrader le fibrinogène, ce qui empêche la réparation cellulaire, perturbe l'hémostase et donc augmente le saignement.(22)

Elle permet également la coaggrégation avec *Porphyromonas Gingivalis* en interagissant avec le long fimbriae.

- Cystalisine

C'est une protéine capable de lyser les érythrocytes

*Treponema Denticola* est résistante à l'action des défencines 1 et 2 produites par l'hôte.(23)

#### 1.4.4. Prevotella intermedia

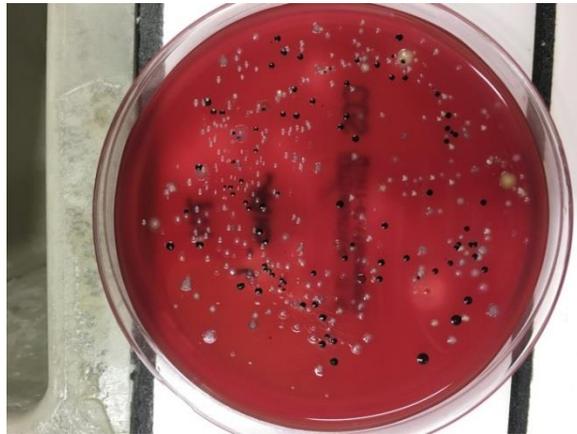


Figure 12: *Prevotella intermedia* sur gélose au sang

*Prevotella intermedia* est une bactérie non motile, Gram négative, anaérobie à pigmentation noire sur gélose. On la retrouve surtout lors de gingivite ulcéro-nécrotique. Elle est résistante aux pénicillines et produit des  $\beta$ lactamases.

Le genre *Prevotella* comprend plus de 40 espèces. Il est responsable d'infections génito-urinaires, et d'infection de la peau et des tissus mous suite à des morsures.

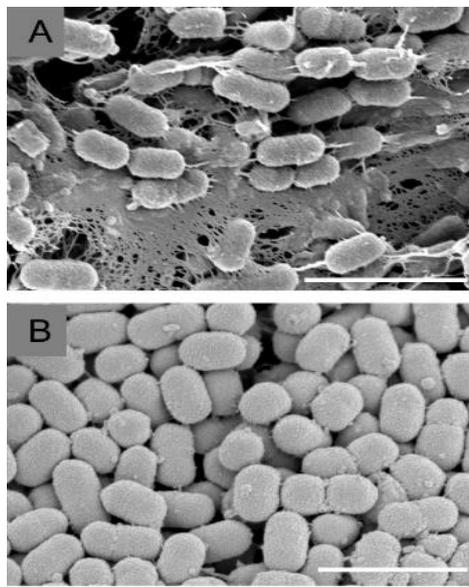


Figure 13 : *Prevotella intermedia* au microscope électronique (Takeshi Yamanaka)

Le facteur de virulence principal associé à cette bactérie est l'Interpain A, une protéinase capable de dégrader le complément C3. (24)

#### 1.4.5. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

*Actinobacillus Actinomycetemcomitans* (Aa) est une bactérie bacille non motile Gram négative, micro-aérophile, capnophile, nécessitant 5 à 10% de CO<sub>2</sub> pour survivre. Elle mesure 0.4-0.1 µm x 0.1-0.4 µm.

Les colonies d'Aa ont une forme d'étoile irrégulière à centre opaque sur gélose au sang cuit (chocolat) et mesurent 0.5mm après 24h et 1 à 2 mm après 48h.

Elle est identifiable par sa capacité à produire de l'acide à partir du glucose, du fructose et du maltose mais pas de l'arabinose, du cellobiose, du mélibiose, du melizitose, de la salicine et du sorbitol. Elle présente une catalase mais pas d'oxydase, d'uréase, d'ornithine et d'indole. Elle réduit les nitrates et produit la phosphatase alcaline.

Elle joue un rôle important dans la parodontite juvénile localisée ainsi que dans la parodontite agressive localisée.

La virulence d'Aa varie en fonction des 7 sérotypes clonaux, le génotype JP2 du sérotype b étant le plus virulent. Ces sérotypes (propriété antigénique permettant d'identifier une bactérie) sont identifiés grâce à l'O-polysaccharide du lipopolysaccharide.

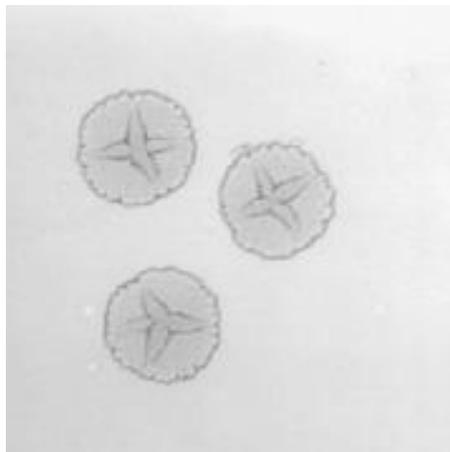


Figure 14 : Structure en étoile d'Aa (Jeffrey B. Kaplan)

Aa possède de nombreux facteurs de virulence, ce qui en fait une des bactéries les plus pathogènes des maladies parodontales. Comme d'autres bactéries, elle possède comme facteur de virulence des vésicules, un lipopolysaccharide, des protéines de la membrane externe, des protéases et des adhésines (Aae, omp 100).

D'autres facteurs de virulence sont plus spécifiques à cette bactérie : Cytotoxine, Antigène de la capsule polysaccharidique, Leucotoxine A, Omp 34 protéine Fc.

La leucotoxine A altère les leucocytes, les lymphocytes et les érythrocytes. Elle provoque également une résorption osseuse en activant les ostéoclastes.

La cytotoxine (Cytolethal distending toxin) entraîne l'arrêt en phase G0/G1 et G2/M des lymphocytes T, des macrophages et des cellules épithéliales. (25)

Elle provoque également l'augmentation d'IFN $\gamma$ , d'IL 1 $\beta$ , IL-6 et IL-8, et l'apoptose des macrophages. (26)

#### 1.4.6. Fusobacterium

Fusobacterium est un bacille anaérobie strict, Gram négatif appartenant à la famille des bactérioidaceae. Son énergie provient de la fermentation d'acides aminés.

Elle est classée en cinq sous-espèces (nucleatum, polymorphum, vincentii, animalis et fusiforme).

Fusobactérium a été retrouvé lors d'infections materno-fœtale ou d'infection du cerveau.

C'est une espèce très fréquemment retrouvée lors de gingivites, parodontites chroniques et agressives. Elle est considérée comme parodonto-pathogène non majeur par sa capacité d'adhérence et au recrutement des bactéries parodonto-pathogènes majeures (Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola).

Fusobacterium nucleatum sert également de pont aux autres bactéries pour la colonisation des sites.(27)



Figure 15 : *Fusobacterium Nucleatum* sur gélose au sang

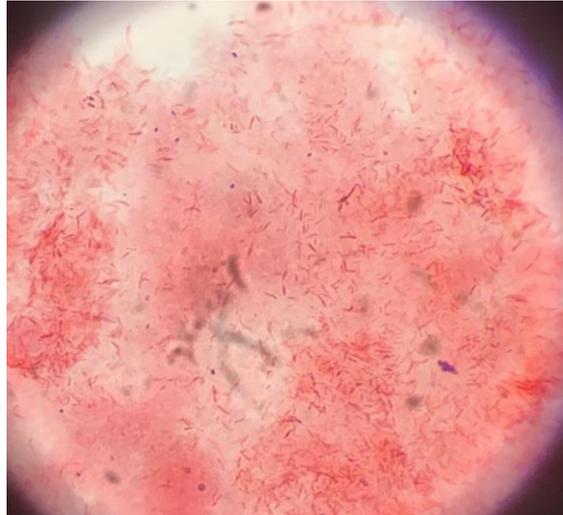


Figure 16 : Coloration de Gram de *Fusobacterium nucléatum*

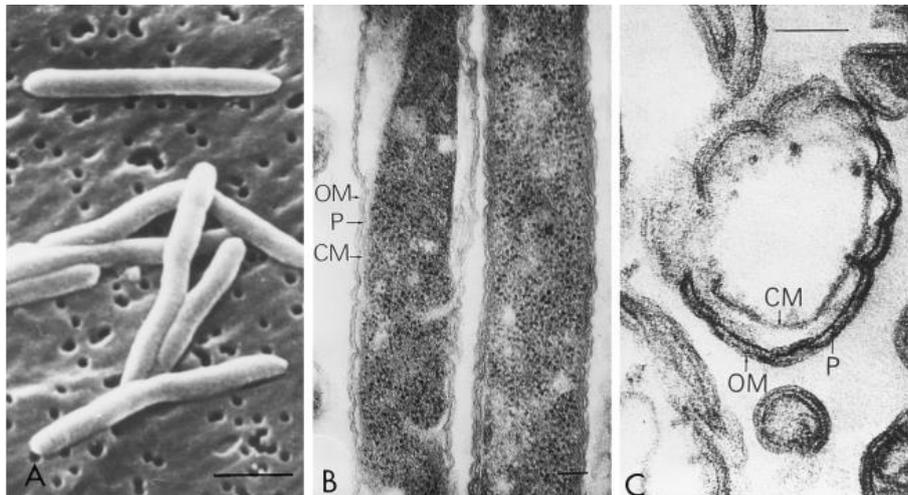


Figure 17 : *Fusobactérium* au microscope électronique. (B) et (C) les flèches montrent la membrane externe (OM), l'espace périplasmique (P) et la membrane interne (CM).

Il joue un rôle dans l'adhésion et dans l'exacerbation de la réponse immunitaire de l'hôte.

Il possède des adhésines (fap 2, rad D, aid1, fad A) qui lui permettent de se lier : aux cellules épithéliales, aux polymorphonucléaires neutrophiles, aux monocytes, érythrocytes, fibroblastes, aux immunoglobulines et à la matrice extracellulaire.(28)

Fad A, en plus de sa capacité d'adhésion, entraîne l'apoptose des lymphocytes et une augmentation des IL 6, IL-8 et TNF $\alpha$ .

#### 1.4.7. Campylobacter

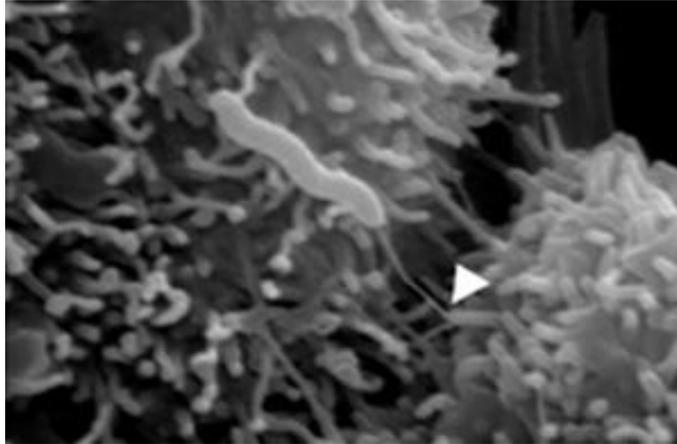


Figure 18 : *Campylobacter rectus* au microscope électronique, la flèche montre le flagelle (Nadeem Omar Kaakoush and Hazel Marjory Mitchell, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, The University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia)

*Campylobacter* est une bactérie spiralée Gram négative, anaérobie, asaccharolytique, motile grâce à un seul flagelle unipolaire qui lui permet de se mouvoir jusqu'à l'espace sous gingival. Elle utilise l'hydrogène comme source d'énergie.

Le genre *Campylobacter* est la principale cause des gastro-entérites, il possède 45 espèces. Les espèces rencontrées lors de parodontites sont *C.conciscus*, *C.curvus*, *C. rectus*, *C. showae*, *C.gracilis*.

D'après une étude réalisée sur 1654 patients atteints de parodontites, *Campylobacter* serait retrouvé chez 80 % de ces patients.(29)

Elle produit une leucotoxine semblable à celle d'*A.actinomycetemcomitans*.(30)

#### 1.4.8. Peptostreptococcus micro

C'est une coque anaérobie à Gram positif. Cette espèce est connue pour provoquer des infections extra orales. Elle a une forme de coque et mesure entre 0,5 et 1,2 µm.

Sa prévalence augmente chez les patients atteints de parodontite chronique.(31)

#### 1.4.9. Eikenella corrodens

*Eikenella corrodens* est une bactérie bacille capnophile à Gram négatif non glucidolytique. Elle mesure 0,3-0,4 µm x 1,5-4 µm. C'est une bactérie que l'on retrouve également dans la flore digestive et génitale et serait responsable, en association avec d'autres bactéries, d'abcès cérébraux, thyroïdiens, de sinusites, d'ethmoïdites ou d'infections oculaires.

Elle est visible sur gélose au sang au bout de 2-3 jours et provoque une légère dépression de celle-ci. La colonie, mesurant 0.5-1mm de diamètre, est rugueuse et convexe. Un halo verdâtre peut se former en périphérie. On remarque une odeur de javel de la culture. (32)

Elle est résistante à la clindamycine et au métronidazole, mais sensible aux macrolides et aminosides.

#### 1.5. Interactions bactériennes

A la surface des tissus dentaires et parodontaux, les bactéries s'organisent en biofilm. C'est une communauté ordonnée bactérienne au sein d'une matrice intercellulaire composée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations, la plupart étant produits par les bactéries. (33)

Au sein de ce biofilm, elles interagissent et adhèrent entre elles et aux tissus environnementaux.

Les bactéries pionnières du biofilm sont des bactéries Gram positif (*Streptococcus sp*, *Actinomyces sp*). Elles adhèrent à la pellicule exogène acquise composée de protéines salivaires et forment la plaque dentaire.

Ces bactéries servent de support aux bactéries colonisatrices secondaires qui sont responsables de l'initiation et de la progression de la maladie parodontale. En effet, elles créent une nouvelle surface pour la colonisation bactérienne, modifient l'environnement local par leur activité métabolique et provoque des conditions propices à la survie des bactéries colonisatrices secondaires, comme un taux d'oxygène diminué.

*Fusobactérium* est une bactérie très importante dans le processus d'initiation de la parodontite, car il a une capacité d'adhérence aux bactéries pionnières ainsi qu'aux bactéries parodonto-pathogènes majeures. Il sert de pont entre ces deux types de bactéries.

Les bactéries colonisatrices secondaires ont une capacité d'adhérence aux cellules épithéliales et aux autres bactéries, essentiellement grâce à des adhésines. Différentes espèces adhèrent entre elles, on parle de coaggrégation, ou d'adhérence bactérienne hétérotypique.

Les interactions bactériennes sont également de nature nutritionnelle, grâce à des signaux moléculaires qui permettent la croissance des espèces et leur régulation face aux changements environnementaux.(34,35). Ces interactions sont possibles grâce à des canaux circulatoires au sein du biofilm allant des couches bactériennes superficielles aux plus profondes.

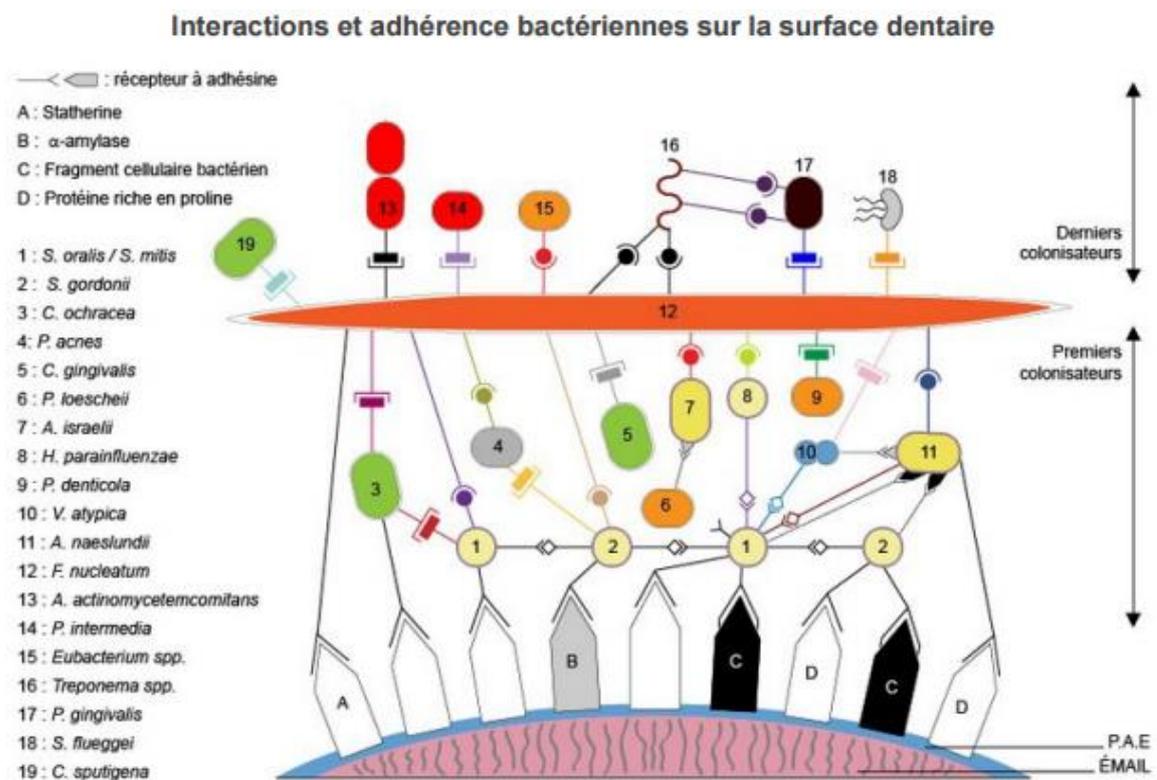


Figure 19 : Organisation du biofilm oral

### 1.6. Complexes bactériens

Chaque type et stade de parodontite sont liés à la présence de groupe particulier de bactéries.

Socransky les a classé en complexes, selon leurs affinités (36). En effet, lorsqu'on détecte une bactérie appartenant à un complexe, il est très probable que les autres bactéries du même complexe soient présentes elles aussi dans le même site.

| <u>Espèces bactériennes</u>  | <u>Complexe de Socransky</u> |
|--|------------------------------|
| <i>Porphyromonas Gingivalis</i><br><i>Treponema denticola</i><br><i>Tannerella forsythia</i>   | Rouge                        |
| <i>Fusobactérium</i> :<br><ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>F.nucleatum</i></li> <li>- <i>F.periodonticum</i></li> <li>- <i>F.vincentii</i></li> <li>- <i>F.polymorphum</i></li> </ul> <i>Prevotella intermedia et nigrescens</i><br><i>Campylobacter</i> :<br><ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>C.gracilis</i></li> <li>- <i>C.rectus</i></li> <li>- <i>C.showae</i></li> </ul> <i>Peptostreptococcus micros</i><br><i>Streptococcus constellatus</i><br><i>Eubacterium nodatum</i> | Orange                       |
| <i>Veillonella Parvula</i><br><i>Actinomyces odontolyticus</i>   | Pourpre                      |

|  |               |
|--|---------------|
| <p><i>Streptococcus</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>S. gordonii</i></li> <li>- <i>S. intermedius</i></li> <li>- <i>S. mitis/oralis</i></li> <li>- <i>S. sanguinis</i></li> </ul>   | Jaune         |
| <p><i>Capnocytophaga</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>C. gingivalis</i></li> <li>- <i>C. ochracea</i></li> <li>- <i>C. sputigena</i></li> </ul> <p><i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i><br/>sérotypage a</p> <p><i>Eikenella corrodens</i></p> <p><i>Campylobacter concisus</i></p> | Vert          |
| <p><i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i><br/>sérotypage b</p> <p><i>Selenomonas noxia</i></p> <p><i>Actinomyces naeslundii</i> espèce génomique 2</p>   | Non groupable |
| <p><i>Actinomyces gerencseriae</i> Aisraelii</p> <p><i>Actinomyces naeslundii</i> espèce génomique 1</p> <p><i>Actinomyces naeslundii</i></p>  | Complexe bleu |

Figure 20 : classification des bactéries en complexes selon Socransky

Au sein de ces complexes, les bactéries coopèrent entre elles afin d'exprimer leur pouvoir pathogène et avoir une action coordonnée. En effet, chaque bactérie prise isolément a un pouvoir pathogène minime.

Il peut également y avoir des interactions entre les complexes. Ainsi, les espèces du complexe rouge interagissent avec celles du complexe orange, et celles du complexe vert interagissent avec celles du complexe jaune.

Les complexes vert et jaune sont considérés comme compatibles avec la santé parodontale. Ce sont principalement des cocci et des bâtonnets Gram positifs.

Les bactéries du complexe pourpre et bleu sont des bactéries pionnières du biofilm, elles rendent l'environnement favorable aux bactéries parodonto-pathogène, à savoir le complexe orange et rouge. Ce sont des coques Gram négatifs, filaments Gram positif et bacilles Gram négatifs.

Les bactéries non groupables, en particulier *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sérotype *b*, sont parodonto-pathogènes et sont retrouvées principalement dans les parodontites juvéniles.

*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella Forsythia* sont retrouvées dans le complexe rouge. Ce sont les bactéries les plus virulentes dans les maladies parodontales. C'est ce complexe qui est le plus retrouvé dans les poches profondes, suivi du complexe orange. Ce sont toutes des bactéries Gram négatifs. La forme est de type bacille ou spirochète.

## 2. Etiologie virale

La présence des bactéries parodonto-pathogènes est nécessaire mais non suffisante pour le déclenchement de la parodontite. Le mode imprévisible de son évolution, sa situation localisée ou généralisée ainsi que son caractère réfractaire dans certains cas nous amène à réfléchir sur une autre étiologie, qui mettrait en jeu des microorganismes non bactériens, comme les virus et les parasites.

Ces dernières années, plusieurs études ont suggéré que des virus comme le virus *d'Epstein-Barr*, l'*Herpès simplex virus* et le *Cytomégalo virus* (CMV), tous faisant partis de la famille des herpes virus, pouvaient jouer un rôle dans les maladies parodontales. Selon deux méta-analyses, la majorité des études montre que leur prévalence augmente dans les cas d'infection parodontale.(37,38)

I.Saygun a montré dans une étude que le *Cytomégalo virus* et le virus *d'Epstein-Barr* étaient corrélés quantitativement avec certaines bactéries parodonto-pathogènes, en particulier *Porphyromonas Gingivalis* et *Tannerella Forsythia*.(39)

Plusieurs hypothèses sur la pathogénie ont été avancées : (40)

- Effet cytotoxique sur les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales et les ostéoblastes
- Altération des PolyMorphonucléaires Neutrophiles (PMN), des macrophages et des lymphocytes, ce qui facilite l'envahissement tissulaire des bactéries
- Expression d'une protéine agissant comme récepteur pour l'adhésion des bactéries(41)
- Immunosuppression et diminution de l'activation du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I.
- Augmentation par le CMV de la production d'IL-1 $\beta$ , de l'interféron  $\alpha$  et du TNF $\alpha$  par les macrophages (42)
- Modification de la réponse inflammatoire par libération de cytokines.

Ils pourraient donc agir en synergie avec les bactéries parodonto-pathogènes et les aider dans la destruction tissulaire et donc dans la progression de la parodontite.

### 3. Etiologie parasitaire

Un parasite est un être unicellulaire eucaryote qui vit au dépend d'un hôte à la surface ou à l'intérieur, et qui créer un état pathologique chez celui-ci.

Plusieurs publications ont suggérées que la maladie parodontale serait, en plus d'une infection bactérienne, une infection parasitaire (ou parasitose) dans laquelle deux parasites protozoaires seraient concernés. Ce sont des organismes micro-aérophiles dont la transmission se ferait par contact oral.

#### 3.1. Entamoeba gingivalis

##### 3.1.1. Morphologie

*Entamoeba gingivalis* est un parasite découvert par Gros en 1849. Il fait partie du genre *Entamoeba* regroupant 6 espèces : *histolytica*, *hartmanii*, *coli*, *dispar*, *polecki* et *gingivalis*. Seule l'espèce *histolytica* est pathogène envers l'homme.

Il fait partie du groupe des protozoaires amibes (ou rhizopodes). On le retrouve dans la cavité buccale mais il a également été identifié dans une étude sur les abcès pulmonaires.(43)

Il mesure 12 à 25 µm de diamètre et existe seulement sous forme trophozoïte (forme végétative permettant la nutrition et donc la croissance du parasite) sans forme kystique (forme immobile avec une paroi permettant la résistance face au milieu extérieur), contrairement à l'autre espèce *Entamoeba Histolytica*.

Il ne possède ni appareil de Golgi ni mitochondries. La nutrition se fait par phagocytose et pinocytose.

Le noyau est unique, avec une chromatine périphérique et un caryosome central. On retrouve dans le cytoplasme des vacuoles digestives permettant, après phagocytose, de digérer des lymphocytes, polynucléaires, bactéries et hématies, ce qui peut lui conférer un aspect granuleux au microscope. (44)

Il se déplace grâce à une émission de pseudopodes, due à la déformation de la membrane plasmique.

La reproduction est asexuée, par scission binaire (division du noyau puis du cytoplasme). (45)

Selon l'étude de Cembranelli, *Entamoeba Gingivalis* posséderait des variabilités intra-génétique de la sous unité ribosomale 18s, ce qui le différencierait en 3 sous espèces.(46)

Cette variabilité génétique est divisée en deux groupes : C (trois nucléotides variants) et E, H14, H57 (polymorphisme nucléotidique unique).

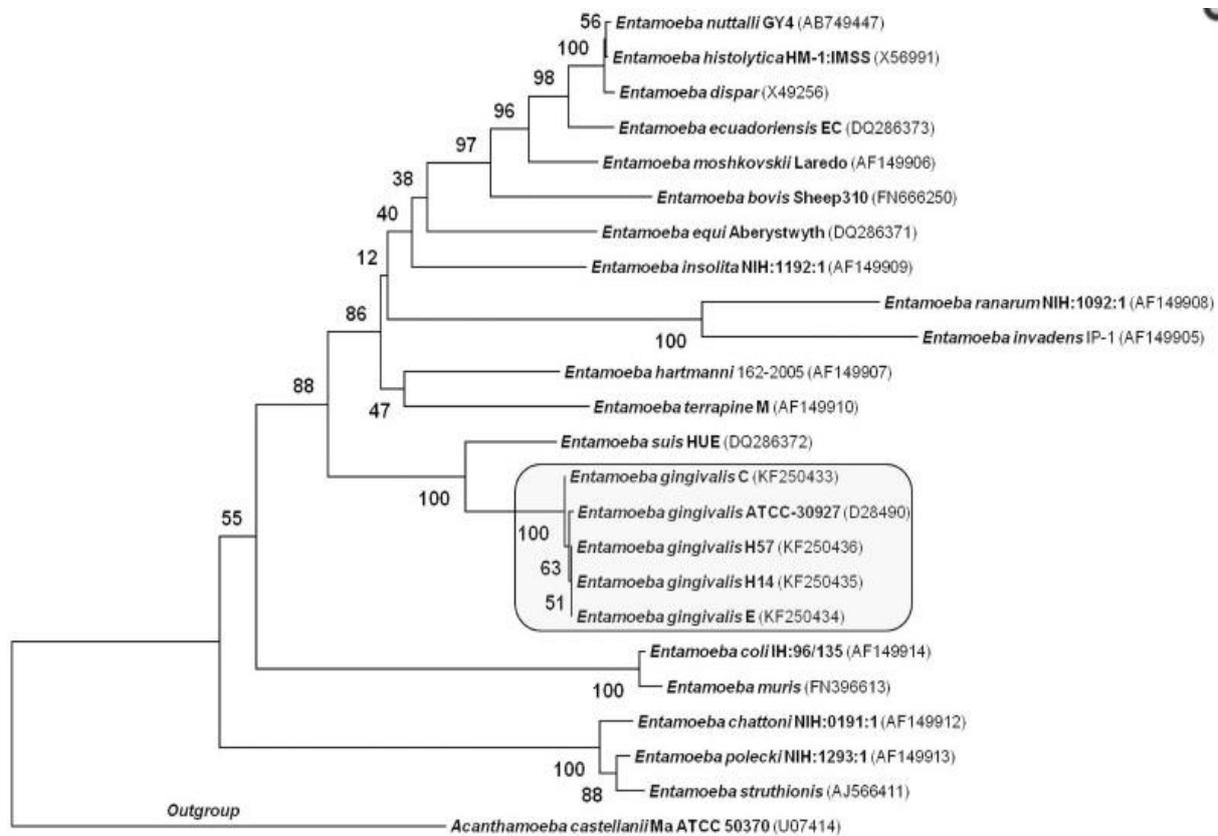


Figure 21 : Relation phylogénétique d'*Entamoeba Gingivalis* chez des patients atteints de HIV, Sibeli B. S. Cembranelli, 2013 (46)

### 3.1.2. Potentielle pathogénicité

Plusieurs hypothèses ont été avancées quant à la pathogénicité d'*Entamoeba Gingivalis*, principalement basées sur la ressemblance avec *Entamoeba Histolytica*.(47)

*Entamoeba Histolytica* est l'agent causal avéré de l'amibiase. Il est sous forme kystique lors de l'infestation, mais non pathogène. Le porteur est sain mais contagieux.

Il devient pathogène lors d'une modification de la flore bactérienne et du système immunitaire de l'hôte, telle que l'augmentation de production d'immunoglobulines. Il est sous forme trophozoïte à ce stade-là, tout comme *Entamoeba Gingivalis*.

Il est cytotoxique envers les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes T et les macrophages. Il provoque, après avoir adhéré à la cellule cible, une augmentation soudaine

de calcium dans celle-ci, une déphosphorylation, et enfin une activation de l'apoptose. Cela crée des lésions ulcérées et une nécrose des tissus. Il n'y a cependant pas de contagion car il n'y a pas de forme kystique.

Ce parasite a une capacité d'adhérence aux cellules de la muqueuse du colon grâce à la lectine. Il a une activité cytolytique et possède des cystéines protéases responsables de la destruction tissulaire et de l'échappement au système immunitaire.

Afin d'échapper au système immunitaire, il possède aussi des phosphoglycanes et des phosphopeptidoglycane à sa surface qui induit une inflammation par la reconnaissance de ceux-ci par les récepteurs Toll-like. D'autres enzymes, comme la superoxyde dismutase ou la L-arginase, participent également à ce contournement du système immunitaire.(48)

*Entamoeba Histolytica* et *Entamoeba Gingivalis* semblent très proches tant sur le plan morphologique que génotypique (78.7 % du génome en commun). On pourrait donc penser qu'ils sont également proches dans la pathogénie. Ceci est tout de même à pondérer par le fait qu'il existe également une sous espèce *Entamoeba Dispar*, morphologiquement identique à *Entamoeba Histolytica* mais non pathogène.

Un pouvoir chimiotactique et une hémolyse des érythrocytes et leucocytes a été observée lors de cultures, ce qui pourrait laisser penser que le parasite joue un rôle dans les mécanismes de réponse immunitaire ainsi que dans la croissance des bactéries par libération du fer contenu dans les hématies. Il y a également la possible existence d'une enzyme protéolytique.

M.Bonner a observé lors d'une étude qu'*Entamoeba Gingivalis* était capable de phagocyter les noyaux des polymorphonucléaires neutrophiles. Cela entraîne un blocage de la formation de fibres extracellulaires par l'hôte (appelé Neutrophile Extracellular Trap) contenant des protéines lytiques comme la Cathepsine G et permettant la lyse des pathogènes.(49)

Il a été observé des leucocytes phagocytés entre les vacuoles cytoplasmiques.(50)

De plus, *Entamoeba Gingivalis* pourrait se comporter comme un cheval de Troie amibien. Ainsi l'amibe pourrait servir d'hôte à des bactéries intracellulaires pathogènes à condition qu'elles survivent à la phagocytose. Cela expliquerait le caractère réfractaire de certaines parodontites car ces bactéries seraient protégées du système immunitaire de l'hôte et des antibiotiques.

*Entamoeba Histolytica* phagocyte également des bactéries, qui restent viables à 70%. Une étude a avancé que l'effet cytolytique du parasite et donc la destruction tissulaire seraient augmentés en présence de bactéries entéropathogènes. (51)

*Entamoeba Gingivalis* pourrait participer à la croissance des bactéries parodontopathogènes en leur apportant les facteurs de croissance nécessaires.

Grâce à ses vacuoles cytoplasmiques, il pourrait être vecteur de virus comme l'Herpes ou CMV qui interviendraient dans la pathogénie des maladies parodontales.

Il pourrait aussi ingérer des cellules infectées par le HIV, et potentiellement transmettre le virus à un autre hôte.

Des auteurs ont introduit *Entamoeba Gingivalis* dans le sulcus gingival de rats et ont observé des abcès parodontaux dans 78.9% des cas.

### 3.2. Trichomonas tenax

#### 3.2.1. Morphologie

*Trichomonas Tenax* est un parasite appartenant à la famille des protozoaires poly-flagellés trophozoïtes, comprenant également *Trichomonas Vaginalis* et *Trichomonas intestinalis*.

Il mesure 7 à 10 µm de diamètre. Il est présent sous une forme végétative non kystique. Il se développe dans un environnement pauvre en oxygène.(52)

Il se déplace grâce à quatre flagelles antérieurs et un flagelle récurrent postérieur. Chaque flagelle antérieur possède un axonème et est inséré sur le cinétosome qui contient l'ATP, source d'énergie. Le flagelle postérieur est en grande partie lié à la paroi du *Trichomonas*, constituant la membrane ondulante (prolongation de la membrane plasmique), et possède une petite portion libre. Le mouvement est oscillant avec des ondulations hélicoïdales de l'extrémité du flagellé à sa base.

Il ne possède pas de mitochondries mais un appareil de Golgi est présent à proximité du noyau unique.

Les éléments nutritifs sont phagocytés, puis ingérés grâce à des vacuoles digestives. La reproduction est asexuée, par scission binaire. (53)

### 3.2.2. Potentielle pathogénicité

Bien que les études manquent pour spécifier le rôle de ce parasite dans l'étiopathogénie des parodontites, il a été montré qu'il existe une activité protéolytique grâce à des cystéines protéases qui hydrolysent le collagène I, III, IV, et V présent dans les tissus parodontaux. Rappelons que ces cystéines protéases, retrouvées dans les bactéries parodonto-pathogènes, participent à la dégradation des tissus parodontaux.(54)

Il posséderait une cathepsine B, qui lui permettrait de contourner les systèmes de défenses de l'hôte. Ainsi, il serait capable d'invasion tissulaire.(55) Il peut également lyser les érythrocytes grâce à deux types d'hémolysines, une protein-like hémolysine et une lipid-like hémolysine.(56)

De plus, *Trichomonas Tenax* est génétiquement très proche de *Trichomonas Vaginalis*. Ainsi, nous pouvons penser que les facteurs de virulence de *Trichomonas Vaginalis* sont également présents chez *Trichomonas tenax*. Parmi ces facteurs nous pouvons trouver des facteurs d'adhérence, une activité hémolytique, une destruction tissulaire grâce aux protéinases et une capacité d'échappement au système immunitaire. (52) (57)

Un cas d'épanchement pleural causé par *Trichomonas Tenax* a également été relaté.

### 3.3. Synthèse bibliographique de la prévalence des parasites dans la cavité buccale

Les études concernant la prévalence diffèrent et ne sont pas comparables scientifiquement en raison de la diversité des protocoles utilisés et des échantillons. En effet, le nombre de sujets, leur âge, leurs pathologies éventuelles, ou bien les évaluations de l'hygiène bucco-dentaire (réalisées sans utilisation d'un indice international de référence) sont autant de facteurs pouvant biaiser les résultats d'une étude.

De plus, la majorité des études a été réalisée à partir de prélèvements de plaque ou de salive et non de fluide gingival. Elles n'étudient donc pas la prévalence du parasite au sein des tissus parodontaux. Elles n'informent pas non plus sur les différents signes d'activité de la parodontite au niveau des sites où ont été identifiés les parasites.

| Etude                                | Nombre de sujets  | Technique utilisée     | Prélèvement  | Prévalence E.g   | Prévalence T.t  |
|--------------------------------------|---|------------------------|--|--|---|
| <u>Ismail, 2017</u>                  | 58 patients atteints de parodontite ou gingivite  | Microscope             | /  | /  | 13 %  |
| <u>Al Kayat, 2016</u>                | 58 patients atteints de gingivite<br>58 sujets sains  | Microscope             | 2 échantillons par patient au sein des poches                              | /  | 56,89 % chez les patients atteints de gingivite<br>6.89% chez les sujets sains  |
| <u>Mehr, 2015</u>                    | 52 patients atteints du syndrome de Down et de maladie parodontale<br>52 sujets sains   | PCR (TGBK-F et TGBK-R) | Pointes de papier dans la poche parodontale                                | /  | 26.9 % des patients atteints de parodontite<br>9.6 % des sujets sains   |
| <u>Fahimeh Rashidi Maybodi, 2016</u> | Parodontite sévère : 29 dont 15 cas (traitement parodontal non chirurgical) et 14 témoins (instruction d'hygiène)<br>Parodontite modérée : 17 dont 8 cas et | Microscope             | Plaque sur la surface dentaire avec curette<br>Salive (0.1mL) avec pipette | Prévalence plaque + salive inversement proportionnelle avec la sévérité<br>Diminution de la prévalence après le traitement | Sévérité corrélée avec la fréquence dans la plaque<br>Pas de corrélation significative dans la salive<br>Diminution de la fréquence après traitement dans la salive |

|                             |  |   |   |   |  |
|-----------------------------|--|---|---|---|--|
|                             | 9 témoins  |   |   |   | mais pas dans la plaque  |
| <u>Süleyman Yazar, 2015</u> | 107 atteints de parodontites<br>68 atteints de gingivite | Microscope optique<br>Culture de Trichomonas Tenax  | Plaque au niveau de la poche la plus profonde dans chaque quadrant à l'aide d'une curette                                     | 35 % chez les patients atteints de parodontite<br>32 % chez les patients atteints de gingivite                                    | 2,8 % chez les patients atteints de parodontite<br>3 % chez les patients atteints de gingivite |
| <u>Bonner, 2014</u>         | 72 patients atteints de parodontite<br>33 patients sains | PCR<br>5'-AGGAATGAACG GAACGTACA-3'<br>5'-CCATTTCTTCT TCTATTGTTTCA C-3'<br>Microscope        | Plaque gingivale à l'aide d'une sonde<br>Milieu de suspension : salive<br>Un seul site par patient                            | Chez les patients atteints de parodontite :<br>68.6 % positifs<br>Chez les patients sains :<br>10.1 % positifs                    | /  |
| <u>Cembranelli, 2013</u>    | 82 patients atteints de HIV                              | PCR<br>EGO 1 :<br>5'-GAATAGGCGCA TTTCGAACAGG-3'<br>EGO 2 :<br>5'-TCCCACTAGTA AGGTACTACTC-3' | Plaque dentaire par grattage de la gencive avec une curette, inséré dans 1mL d'eau saline stérile<br>Un seul site par patient | 56.1 % PCR<br>36.6 % Microscope<br>Pas d'association entre la prévalence d'Entamoeba Gingivalis et le nombre de Lymphocytes T CD4 | /  |

|                             |  |                           |   |   |   |
|-----------------------------|--|---------------------------|---|---|---|
|                             |  | Microscope                |   |   |   |
| <u>Sumaiah Ibrahim 2012</u> | 60 patients atteints de parodontite ou de gingivite<br><br>25 patients sains | Microscope                | Plaques<br><br>Salive<br><br>2 échantillons par patient   | 58,3 % positifs dans les échantillons de plaque dont 16% de patients sains<br><br>60 % positifs dans les échantillons de salive dont 24 % de patients sains | 31.6 % positifs dans les échantillons de plaque dont 20 % de patients sains<br><br>33.3 % positifs dans les échantillons de salive dont 12 % de patients sains  |
| <u>El Sibaei, 2012</u>      | 70 patients atteints de parodontite ou de gingivite                          | Microscope<br><br>Culture | Plaques et/ou<br>Tartre sub-gingival avec une curette stérile<br><br>2 échantillons par patient, au total 110 de plaque et 30 de tartre | /   | 28,60 % positifs<br><br>Croissance différente selon les isolats (tout comme T. vaginalis)<br><br>Profils protéiques différents (53 bandes dont 19 communes)<br><br>7 bandes protéolytiques différentes, dont 3 correspondant à des cystéines protéinase et 4 des métallo-protéinases<br><br>Activité protéolytique influencées par un inhibiteur ou activateur de cystéines protéinases |
| <u>Onyido, 2011</u>         | 60 cas   | Microscope                | Plaques sur la surface  | Cas : 31.67 %   | Cas : 21 %  |

|                                 |  |  |  |  |   |
|---------------------------------|--|--|--|--|---|
|                                 | 60 témoins   |  | dentaire                                   | Témoins : 3 %  | Témoins : 0 %   |
| <u>Albuquerque Junior, 2011</u> | 20 patients atteints de gingivites<br>22 patients atteints de parodontite<br>9 sains | Microscope<br>pH salivaire   | Plaque<br>Salive                           | <u>Echantillons de plaque :</u><br>parodontites : 50%<br>gingivites : 50%<br>sains : 0 %<br><u>Echantillons de salive :</u><br>Parodontites : 61%<br>Gingivites : 39%<br>Sains : 0 % | <u>Echantillons de plaque :</u><br>Parodontites : 41.67 %<br>Gingivites : 16.66%<br>Sains : 41.67 %<br><u>Echantillons de salive :</u><br>Parodontites : 40%<br>Gingivites : 20 %<br>Sains : 40 % |
| <u>Trim, 2011</u>               | 26 patients atteints de parodontite<br>12 patients sains                             | <u>PCR conventionnelle :</u><br>EGO 1 et EGO 2<br><u>PCR temps réel</u><br>EGHF 5'-<br>TACCATACAAGG<br>AATAGCTTTGTG<br>AATAA<br>EGHR 5'-<br>ACAATTGTAAATT<br>TGTTCTTTTCT | Poches parodontales avec pointes de papier | <u>PCR conventionnelle :</u><br>27 % positifs dans les parodontites<br>0 % sains<br><u>PCR à temps réel :</u><br>69 % dans les parodontites<br>0 % sains                             | /   |
| <u>Abualqomsaan, 2010</u>       | 33 patients atteints de  | Microscope   | Plaque dentaire                            | 19.44 % sur les 46 patients  | 2.17 % sur les 46 patients  |

|                          |   |  |   |   |   |
|--------------------------|---|--|---|---|---|
|                          | parodontite<br>13 patients<br>sains   |  |   | Parodontite : 21.2 %<br><br>Sains : 7.69 %  |   |
| <u>Ozcelik, 2010</u>     | 220 patients  | Microscope   | /   | 26.4 % positifs sur les 220 patients<br><br>Dont :<br>- 21.8 % positifs seulement pour Entamoeba Gingivalis<br>- 3.6 % positifs pour la présence des deux parasites |   |
| <u>Ghabanchi, 2010</u>   | 50 patients atteints de parodontite<br><br>50 patients sains                | Microscope   | Salive<br><br>Fluide gingival                         | 12 % des patients atteints de parodontite<br><br>0,5 % des patients sains   | 6 % des patients atteints de parodontite<br><br>0 % des patients sains                          |
| <u>Athari, 2007</u>      | 160 patients atteints de gingivite ou parodontite<br><br>160 patients sains | Microscope<br><br>PCR :<br>TGBK-F 5'-AGC AGC TGC GGT AAT TCC AG-3'<br><br>TGBK-R 5'-CTT GTT ACC ACT TCT CCT TCC-3' | Plaque sous gingivale au sein des poches parodontales | /   | PCR :<br><br>20.6 % des patients atteints de parodontite ou de gingivite<br><br>1.8 % des sains |
| <u>Turkowicz, 2004</u>   | 54 patients atteints de HIV   | PCR (T1 et T2)   | /   | /   | 5.5 % des sujets HIV positifs   |
| <u>Kurnatowska, 2004</u> | 91 patients atteints de parodontite   | PCR (amorces inconnues)  | /   | /   | 37 %  |

|                            |   |   |   |   |   |
|----------------------------|---|---|---|---|---|
| <u>Ponce de Leon, 2001</u> | 50 patients   | Microscope<br>pH salivaire<br>IgA   | Plaque/tarte<br>4 sites<br>(incisives<br>inférieures)<br>Salive | 66 %  | 20 %  |
| <u>Zhongquo, 2001</u>      | 551 étudiants   | Microscope  | Plaque  | 41,2 % des<br>patients atteints<br>de parodontite<br>20,8 % de sujets<br>sains  | /   |
| <u>Pomes, 2000</u>         | 62 patients   | Microscope  | Plaque sous-<br>gingivale<br>6 sites par<br>patient             | 21 %  | /   |
| <u>Lucht, 1998</u>         | 45 patients<br>infectés par le<br>VIH<br>15 sujets<br>séronégatifs                | Microscope  | Salive<br>Plaque supra<br>et sous-<br>gingivale                 | 22 % chez les<br>patients<br>séropositifs<br>Parmi ces 22 %,<br>77 % étaient<br>atteint de<br>parodontite<br>7 % chez les<br>sujets<br>séronégatifs |   |
| <u>Kikuta, 1997</u>        | 9 patients<br>atteints de<br>parodontite<br>ou de<br>gingivite<br>10 sujets sains | PCR<br>(PT3),<br>5'AGTTCCATCGA<br>TGCCATTC-3'<br>(PT7), 5'-<br>GCATCTAAGGAC | Plaque sous-<br>gingivale                                       | /   | 55.6 % chez les<br>patients atteints<br>de parodontite<br>ou de gingivite<br>0 % chez les<br>sujets sains |

|                         |  | TTAGACG-3'   |   |  |       |
|-------------------------|--|--|---|--|-------|
| <u>Kikuta, 1996</u>     | 8 patients atteints de gingivite ou de parodontite<br><br>Au total 32 échantillons                               | PCR<br>(EGO-1), 5'-GAATAGGCGCAT<br>TTCGAACAGG-3'<br>(EGO-2), 5'-TCCCCTAGTAA<br>GGTACTACTC-3'<br><br>Microscope | plaque sous-gingivale avec une curette                | 6.25 % (2 positifs sur 32 échantillons)  | /     |
| <u>El Hayawan, 1994</u> | 200 patients atteints de parodontite ou de gingivite   | Microscope   | /   | 55,5 % chez les patients atteints de parodontite<br><br>42 % chez les patients atteints de gingivite   | /     |
| <u>El Azzouni, 1994</u> | 10 patients avec une parodontite avancée<br><br>10 patients ayant reçu une chimiothérapie<br><br>10 sujets sains | Microscope   | Deux échantillons par patient, à l'aide d'une curette | Patients avec une parodontite avancée :<br><br>- Avant traitement par flagyl : 64 %<br><br>- Après traitement par flagyl : 26 %<br><br>Patients ayant reçu une chimiothérapie : 58 %<br><br>Sujets sains : 34% | /     |
| <u>Vrablic, 1991</u>    | 176 sujets   | Microscope   | /   | 14,2 %   | 1.1 % |

|                               |   |            |   |  |  |
|-------------------------------|---|------------|---|--|--|
|                               |   |            |   | 18.2 % positif pour Entamoeba Gingivalis et Trichomonas Tenax  |  |
| <u>Linke, 1989</u>            | 10 patients atteints de parodontite avancée non traitée | Microscope | Plaque adhérente aux racines<br>10 sites par patient à l'aide d'une curette stérile | 100 %<br>Poche 1-3mm : 29 %<br>Poche 4-6mm : 53 %<br>Poche 7-9mm : 18 %                                | /  |
| <u>Lyons and Palmer, 1983</u> | 200 patients  |            |   | 62,5 %   |  |
| <u>Feki, 1981</u>             | 300 patients  | Microscope | Plaque<br>Tartre  | Sujets sains: 40%<br>Patients atteints de gingivite: 57,3%<br>Patients atteints de parodontite: 54,8 % | Sujets sains:13%<br>Patients atteints de gingivite: 32,3 %<br>Patients atteints de parodontite: 38,5 % |
| <u>Dao, 1981</u>              | 113 patients atteints de parodontite<br>96 sujets sains | /          | /   | 59 % chez les sujets atteints de parodontite<br>32 % chez les sujets sains                             | /  |
| <u>Cambon, 1979</u>           | 509 sujets sains ou diabétiques                         | /          | /   | 85 %   | /  |

|                       |               |            |  |   |  |
|-----------------------|---------------|------------|--|---|--|
| <u>Omnes, 1975</u>    | /             | /          | /  | <p>Sujets sains: 16,2 %</p> <p>Patients atteints de gingivite: 18,2 %</p> <p>Patients atteints de parodontite :</p> <p>- modérée: 30,4 %</p> <p>- avancée: 24 %</p>               | /  |
| <u>Gotlieb, 1971</u>  | 30 patients   | Microscope | <p>Plaque provenant des poches gingivales</p> <p>Coupes histologiques gingivales</p> | <p>Microscope: 53%</p> <p>Coupe histologique:</p> <p>- 17 % chez les patients atteints de parodontite modérée</p> <p>- 90 % chez les patients atteints de parodontite avancée</p> | /  |
| <u>Wantand, 1970</u>  | 1036 patients | Microscope | <p>Plaque dans les poches</p> <p>Tartre</p> <p>Cavités carieuses</p>                 | <p>Sujets sains: 21%</p> <p>Patients atteints de parodontite :</p> <p>- modérée: 60 %</p> <p>- avancée: 92 %</p>  | <p>Sujets sains: 11%</p> <p>Patients atteints de parodontite :</p> <p>- modérée: 33 %</p> <p>- avancée: 50 %</p> |
| <u>Gottlieb, 1968</u> | /             | Microscope | Plaque   | <p>Sujets sains: 7 %</p> <p>Patients atteints de gingivite ulcéro-nécrotique: 90%</p>   | /  |

#### 4. Un point sur les défenses de l'hôte

Tous ces agents microbiens que nous venons d'aborder ne sont pas les seuls responsables de la parodontite. Les bactéries parodonto-pathogènes peuvent tout à fait se retrouver dans la cavité orale d'un sujet sain. C'est la nature de la réponse immunitaire qui conditionne le développement de la parodontite.

Une réponse immunitaire incontrôlée peut entraîner une destruction parodontale par les cellules immunitaires de l'hôte.

Face à une invasion microbienne et à la production de facteurs de virulence (comme le LPS par exemple), l'hôte va déclencher une réponse immuno-inflammatoire.

La première ligne de défense est composée de polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et de monocytes/macrophages.

Les PMN reconnaissent les bactéries au moyen de leur PRR (recepteur membranaire présent à la surface, principalement des récepteurs Toll-Like) ce qui induit une phagocytose. Ils jouent également un rôle dans la production et la régulation des cytokines pro et anti inflammatoires.

Une dysfonction de ces PMN, innée (neutropénie, agranulocytose) ou induite par les bactéries, entraîne une diminution des capacités de défense des tissus et donc une perte d'attache.

Les monocytes phagocytent les PMN apoptotiques et les débris cellulaires. Les cellules immunitaires, les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes gingivaux, produisent des Metalloprotéinases matricielles (MMP). Ce sont des protéinases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, qui sont sous le contrôle des cytokines.

Lors d'une parodontite, il y a une exacerbation de production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- $\alpha$ , PGE2), notamment par les monocytes. Il y a également une augmentation de l'expression de RANKL, qui se fixe sur son récepteur RANK, active les ostéoclastes et entraîne une résorption osseuse. (58)

L'IL-1 $\beta$  augmente la production de ces MMP et donc favorise la destruction tissulaire.

Une réponse immunitaire cellulaire (LT, LB) et humorale est mise en place après la présentation des Antigènes par les macrophages au moyen du complexe majeur d'histocompatibilité. Les lymphocytes B expriment eux aussi le RANKL, l'IL-6 et le TNF $\alpha$ , participant à l'ostéoclastogénèse.

PARTIE 2

ETUDE CLINIQUE

## 1. Matériel et méthodes

La recherche que nous avons réalisée est une recherche non interventionnelle avec échantillons biologiques humains.

Notre hypothèse principale est une présence d'*Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax* dans les sites atteints par la parodontite.

Notre première hypothèse secondaire est une association entre les bactéries parodonto-pathogènes et la présence des parasites.

Notre deuxième hypothèse secondaire est un lien entre la profondeur des poches et la présence d'*Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax*.

### 1.1. Objectifs de l'étude

Notre objectif principal dans cette étude est d'évaluer la prévalence d'*Entamoeba Gingivalis*, de *Trichomonas Tenax* chez les patients atteints de parodontite au moment de la consultation initiale ;

Notre premier objectif secondaire est de comparer les bactéries retrouvées dans les échantillons positifs et celles retrouvées dans les échantillons négatifs.

Notre deuxième objectif secondaire est de corrélérer la profondeur de poche et la présence des deux parasites.

### 1.2. Critères d'évaluation

Le critère d'évaluation est l'identification des protozoaires et des bactéries parodonto-pathogènes.

L'identification des parasites est faite à l'aide d'une réaction en chaîne par polymérase conventionnelle. L'identification des bactéries est faite à l'aide d'un test enzymatique Rapid ID 32 A ou d'une spectrométrie de masse.

Ceci sera réalisé à partir d'échantillons microbiens prélevés dans les poches les plus profondes retrouvées chez des patients atteints de parodontite au moment de la consultation initiale.

### 1.3. Population étudiée

#### 1.3.1. Critères d'inclusion

- Adulte > 18 ans
- Atteint de parodontite chronique ou agressive, localisée ou généralisée.

#### 1.3.2. Critères de non inclusion

- Prise d'une antibiothérapie systémique pouvant altérer la flore microbienne parodontale et/ou de tout médicament influençant cette flore dans les trois mois précédents le prélèvement
- Surfaçage radiculaire réalisé dans les trois mois précédant le prélèvement
- Patient non consentant pour l'étude.

### 1.4. Protocole de prélèvement

Préalablement, il est conseillé de réaliser un calendrier de tous les prélèvements, avec toutes les étapes qui suivent afin de garder une rigueur de travail et de respecter tous les temps d'incubation nécessaires à la pousse des bactéries.

#### Matériel nécessaire :

- 2 ml de milieu de transport RTF régénéré préalablement préparé et contenu dans un tube à essai stérile
- Sonde millimétrée
- Mini Ceka 6
- Compresses
- Eau stérile

### Protocole :

- Sélectionner deux sites de prélèvement correspondants aux poches les plus profondes à l'aide d'une sonde millimétrée
- Nettoyer la zone à l'aide d'une compresse imbibée d'eau stérile
- Sécher la zone avec une compresse (pas de soufflette)
- Placer une curette au fond de la poche et remonter le long de la surface radiculaire sans forcer.
- Agiter la curette dans le tube contenant le milieu de transport afin de recueillir l'échantillon prélevé

#### 1.5. Transport et conservation des échantillons

La conservation des échantillons dans le milieu RTF est de maximum 24h en température ambiante.

#### 1.6. Cultures des bactéries

##### 1.6.1. Mise en culture

### Matériel nécessaire :

- Tubes en verres bouchonnés stériles (3 par échantillon)
- Embouts stériles 1mL
- Embouts stériles 200 µL
- Râteaux d'étalement
- Pipettes automatiques
- Vortex
- Boîtes de Pétri (x12) avec gélose au sang
- Echantillon

Protocole :

- Identification des boîtes de pétri à l'aide d'un marqueur sur la face inférieure et non sur le couvercle. Il faut 6 boîtes par échantillon.

Numéro de patient

Numéro d'échantillon → 1 et 2

Trois dilutions par échantillon →  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$

Mise en culture en anaérobiose et sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> → A et C

- Dispersion de l'échantillon au vortex pendant 1 minute
- Dilution
  - Distribuer 9.9 ml d'eau distillée dans 2 tubes et 9 ml dans 4 tubes (3 par échantillon, soit  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ )
  - Prendre 100 µL de l'échantillon à l'aide d'une micropipette et d'un embout 200µL et l'introduire dans l'eau distillée du premier tube (dans 9.9 ml = dilution  $10^{-2}$ )
  - Placer le tube n°1 au vortex pendant quelques secondes
  - Changer de micropipette et prendre un embout de 1 ml
  - Prendre 1 ml de la solution du tube n°1 et l'introduire en dessous de la surface du milieu de dilution du tube n°2 (dans 9 ml = dilution  $10^{-3}$ )
  - Placer le tube n°2 pendant quelques secondes au vortex.
  - Changer d'embout
  - Prendre 1 mL de la solution du tube n°2 et l'introduire en dessous de la surface du milieu de dilution du tube n°3 (dans 9 ml = dilution  $10^{-4}$ )
  - Placer le tube n°3 au vortex pendant quelques secondes
- Ensemencement

Placer les boîtes de Pétri de l'échantillon sur le plan de travail du PSM.

Pour l'échantillon 1 →  $10^{-2}$  A1,  $10^{-3}$  A1,  $10^{-4}$  A1

- Ouvrir le couvercle de chaque boîte de pétri
- Prélever 100µL du tube n°3 (dilution  $10^{-4}$ ) avec une micropipette et un embout de 200µL et le déposer au centre de la gélose correspondant à cette dilution ( $10^{-4}$ A1)
- Faire la même manipulation avec les tubes n° 2 et 1 sans changer d'embout (pas nécessaire lorsqu'on manipule de la plus faible à la plus forte concentration).

- Prendre un râteau et étaler la dilution sur toute la surface de la gélose des 6 boîtes, en allant de la moins concentrée à la plus concentrée, jusqu'à ce qu'elle commence à l'absorber et devenir légèrement collante.
- Refermer les couvercles
- Mettre les boîtes de Pétri destinées à une culture anaérobie dans un sac de culture en position retournée (le couvercle vers le bas pour que la condensation à l'intérieur des boîtes ne coule pas sur la gélose) avec un sachet d'anaérobiose GENbag anaer (générateur individuel pour l'incubation des bactéries anaérobies) et le refermer hermétiquement.
- Faire de même pour les boîtes de Pétri destinées à une culture riche en CO<sub>2</sub>, avec un sachet GENbag CO<sub>2</sub> (générateur individuel pour l'incubation des bactéries exigeantes en CO<sub>2</sub>).

### **Sept jours après mise en culture**

#### **1.6.2. Description morphologique et comptage des différentes colonies observées après culture en milieu riche en CO<sub>2</sub> ou anaérobie, suivant la dilution.**

- La forme : ronde, irrégulière, en étoile
- Le relief : bombé, plate, en vague concentrique
- Le contour : régulier ou irrégulier
- Taille :

Inférieur à 1 mm → colonie punctiforme

Entre 1 mm et 2 mm → petite colonie

Entre 2 et 3 mm → colonie moyenne

Supérieur à 3 mm → grande colonie

- Surface : lisse ou rugueuse
- Couleur

### 1.6.3. Repiquage

Pour les cultures dans un milieu riche en CO<sub>2</sub> :

Nous devons déterminer si les colonies sont aérobies ou bien capnophiles donc on va préparer une gélose destinée à une culture dans un milieu aérobie (atmosphère ambiante) ou bien dans un milieu riche en CO<sub>2</sub>.

Pour les cultures anaérobies :

Nous devons déterminer si les colonies sont anaérobies stricts donc on va préparer une gélose destinée à une culture anaérobie, et une autre destinée à un milieu aérobie.

#### Matériel nécessaire pour chaque échantillon:

- Deux nouvelles géloses pour chaque milieu initial afin de déterminer les conditions de survie des différentes colonies observées sur les premières géloses.
- Deux lames correspondants à chaque milieu initial (soit anaérobie et riche en CO<sub>2</sub>). Cela permettra de réaliser une coloration de Gram.
- Oêses stériles jetables
- Fiche de comptage et de description des colonies
- Marqueur

#### Protocole :

- Quadriller et identifier chaque nouvelle gélose. Un numéro correspond à une colonie identifiée précédemment.

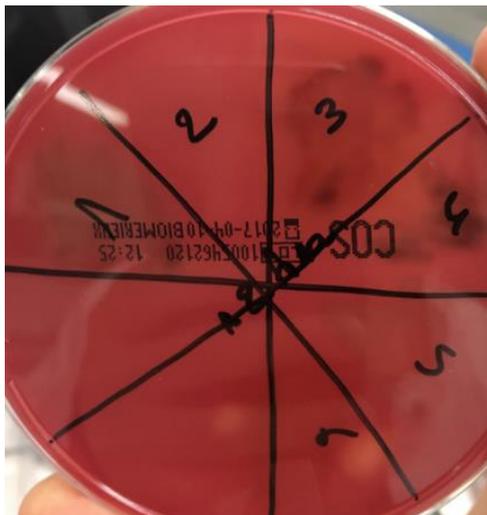
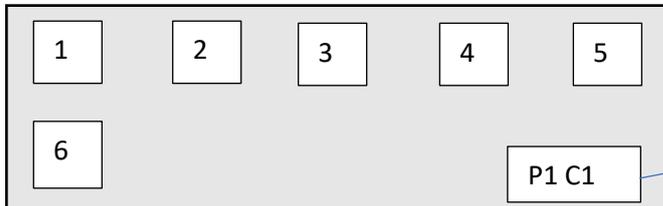


Figure 22 : quadrillage et numérotation des géloses

- Déposer une goutte d'eau à l'aide d'une oëse à l'emplacement prévu de chaque dépôt de colonie sur une lame de verre.
- Prélever un échantillon de chaque colonie et le placer à l'aide d'une oëse sur un des emplacements quadrillé de la nouvelle gélose, ainsi que sur une des gouttes d'eau sur la lame (dispersion).

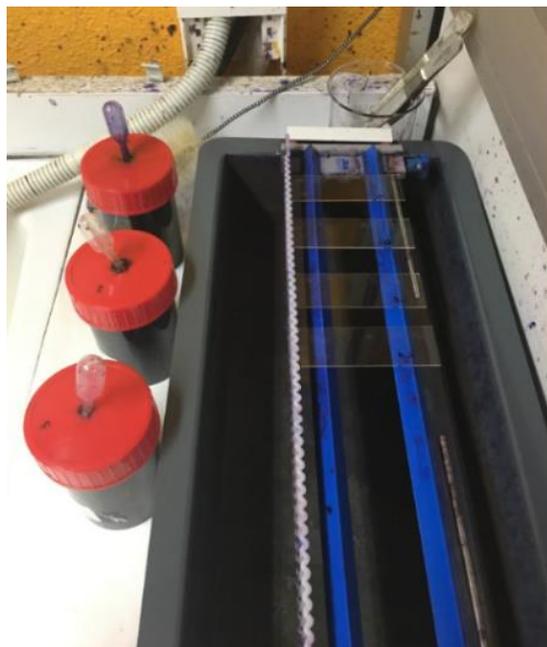


Identification sur le dos de la lame afin d'éviter que le marqueur s'efface lors de la coloration

*Figure 23 : schéma d'une lame de verre avant observation au microscope*

#### 1.6.4. Coloration de Gram

- Placer les lames à l'horizontale après séchage complet
- Déposer le violet de Gentiane sur les échantillons de colonie, laisser poser 1 minute et rincer à l'eau
- Déposer le Lugol, laisser poser 1 minute et rincer à l'eau
- Décolorer l'alcool puis rincer à l'eau
- Déposer la Safranine, laisser poser 1 minute et rincer
- Sécher les lames en les plaçant sur un papier absorbant



*Figure 24 : Coloration de Gram*

### 1.6.5. Observation au microscope des quatre lames (A1, A2, C1, C2)

#### Préparation :

- Immerger la lame avec de l'huile à immersion
- Placer la lame sur le microscope avec un grossissement x100 (le grossissement est donc de 1000 du fait du grossissement de la lunette du microscope qui est x10)

#### Observation :

→ La forme des bactéries : bacille, coque ou coccobacille

→ Leur coloration : les bactéries rose pâle sont Gram négatif, les violettes sont Gram positif.

#### Après 5 à 7 jours

### 1.6.6. Comparaison des géloses après repiquage des colonies

#### Cultures initialement incubées dans un milieu riche en CO<sub>2</sub>:

Observation de la gélose placée en aérobic. Cela permet d'éliminer les colonies (identifiées par des numéros) qui ont poussé. Elles ne sont pas capnophiles.

#### Cultures initialement incubées en anaérobic :

Observation de la gélose placée en milieu riche en CO<sub>2</sub>. Cela permet d'éliminer les bactéries qui ont poussé et qui ne sont donc pas anaérobies strictes.



*Figure 25 : Gélose après incubation*

### 1.6.7. Repiquage sur gélose des bactéries à identifier

Nous repiquons en milieu riche en CO<sub>2</sub> les colonies qui n'ont poussé qu'en milieu riche en CO<sub>2</sub>, et en milieu anaérobie les colonies qui n'ont poussé qu'en milieu anaérobie. Nous repiquons deux colonies par boîte de pétri.

Exemple de codage sur la boîte de pétri : « P1C1C5 » pour patient n°1, milieu initial riche en CO<sub>2</sub>, échantillon n°1, repiquage en milieu riche en CO<sub>2</sub>, colonie n°5 .

## **Après 7 jours**

### 1.7. Identification des bactéries

Nous avons utilisé deux méthodes pour l'identification des bactéries : le test rapid ID 32 A (patient 1, 2, 3 et 21) et la spectrométrie de masse (patient 1 à 20). Cette dernière a été privilégiée en raison de sa rapidité et de son moindre coût.

#### 1.7.1. Test Rapid ID 32 A

Ce test comprend 29 réactions enzymatiques et permet l'identification de plus de 600 espèces bactériennes.

#### Matériel nécessaire :

- Milieu de suspension
- Gélose avec colonie bactérienne à identifier
- Réactif NIT 1 et 2, JAMES et FB
- Micropipette 200µL avec embout
- Oese
- Huile de paraffine

### Préparation du test :

- Ouvrir l'ampoule contenant le milieu de suspension
- Introduire un échantillon significatif de la colonie bactérienne avec une oese
- A l'aide d'une micropipette, introduire 55µl de solution dans chaque puit de la galerie de test enzymatique
- Rajouter les réactifs nécessaires et l'huile de paraffine selon le protocole du fabricant
- Attendre 4h pour interpréter les réactions.
- Faire la lecture visuelle selon le tableau fourni avec le test et le transcrire sur une fiche de résultat.
- Se connecter sur le site Apiweb® et inscrire les résultats selon les chiffres obtenus sur la fiche pour avoir l'identification de la bactérie.



Figure 26 : Test rapid id 32 A

#### 1.7.2. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse Maldi-Tof est une technique d'identification correspondant à une analyse des molécules ionisées par la matrice. Un laser est dirigé vers les spots (préalablement cristallisés en séchant avec la matrice) et l'analyseur TOF sépare les ions grâce à un tube de vol, qui va accélérer les ions et analyser leur vitesse. Celle-ci sera fonction de leur masse et de leur charge. Le détecteur enregistre un signal électrique et l'envoi à un système de traitement informatique qui permet d'obtenir un spectre de masse.

### Préparation préalable à la dépose des colonies :

- Préparer 1 ml d'acide formique à 70 % vol/vol soit 700µL d'acide formique et 300µL d'eau déminéralisée. La solution se conserve 1 mois à température ambiante.
- Reconstituer un micro-tube de matrice (IVD Matrix HCCA, conservée à 4°C, frigo microbiologie) en ajoutant 250 µL de solvant organique Sigma (Acétonitrile/eau/acide tétra-fluoro-acétique, dans l'armoire des solvants) dans le micro-tube de matrice. Agiter au vortex, faire tomber les gouttes à la centrifugeuse. La solution ainsi préparée se conserve 1 semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière.

### Protocole de dépôt :

Il faut toujours manipuler la plaque avec des gants.

- déposer 1 µL de BTS (contrôle *Escherichia Coli*) sur le spot A1 (décongeler 1 aliquote de la boîte "BTS", tiroir Sophie, Congélateur microbiologie). Attendre le séchage complet, ajouter 1 µL de matrice reconstituée.
- déposer les colonies bactériennes sur les spots de la plaque avec un cône stérile, attendre le séchage complet. Les colonies doivent idéalement être repiquées depuis moins de 72h. Le dépôt doit être fin.
- déposer 1 µL d'acide formique à 70 % sur les spots bactériens, attendre le séchage complet. Ceci permet d'extraire les protéines et donc de faciliter l'identification.
- déposer 1 µL de matrice reconstituée, attendre le séchage complet
- Parallèlement, il faut remplir le tableau de la plaque avec le nom de la souche correspondant au spot (ex : P3 2AA1 qui correspond au spot A10 sur la plaque).

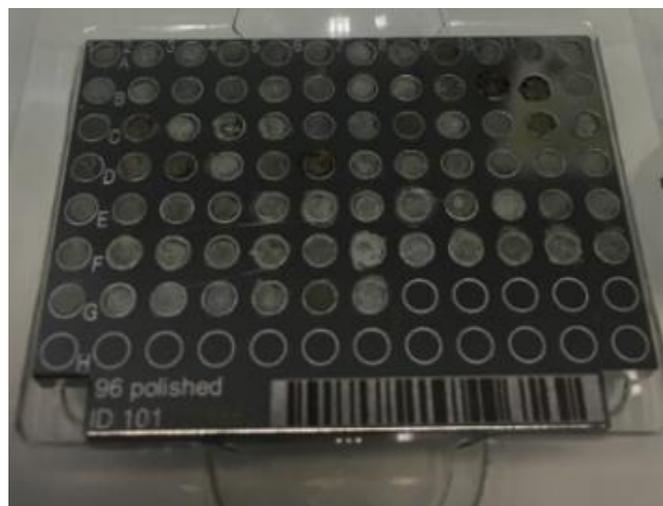
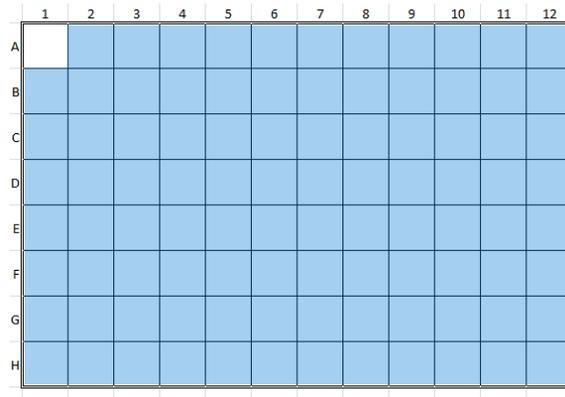


Figure 27 : Plaque de spectrométrie



*Figure 28 : Plan de plaque*

La plaque est ensuite insérée dans le spectromètre de masse et l'identification des souches bactériennes est transmise au logiciel qui compare avec une banque de spectres de référence et nous donne la souche ayant le plus grand pourcentage de ressemblance avec une souche de la banque de données.



*Figure 29 : Spectromètre de masse*

1.8. Fiches à remplir pendant toute la durée du protocole d'identification des bactéries pour chaque patient

Etude sur la prévalence d'Entamoeba Gingivalis, Trichomonas Tenax et la flore associée dans les parodontites

Patient n° :

Date :

Age :

Fumeur :

Pathologie chronique :

Antibiotiques depuis moins de 3 mois :

Traitement parodontal antérieur :

Diagnostic :

Bilan parodontal des sites prélevés

| <u>Site</u> | <u>Saignement</u> | <u>Sondage</u> | <u>Récession</u> | <u>Mobilité (0à 3)</u> |
|-------------|-------------------|----------------|------------------|------------------------|
|             |                   |                |                  |                        |
|             |                   |                |                  |                        |

Identification morphologique des coloniesPatient n° :

Date :

1A 10<sup>-2</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

1C 10<sup>-2</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

1A 10<sup>-3</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

1C 10<sup>-3</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

1A 10<sup>-4</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

1C 10<sup>-4</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

Patient n° :

Date :

2A 10<sup>-2</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

2C 10<sup>-2</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

2A 10<sup>-3</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

2C 10<sup>-3</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

2A 10<sup>-4</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

2C 10<sup>-4</sup>

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

Coloration de Gram

Patient n° :

Date :

1A

1)

2)

3)

4)

5)

6)

2A

1)

2)

3)

4)

5)

6)

1C

1)

2)

3)

4)

5)

6)

2C

1)

2)

3)

4)

5)

6)

Colonies anaérobies strictes :

Colonies capnophiles :

## 1.9. Identification d'Entamoeba Gingivalis et Trichomonas Tenax : Réaction en chaine par polymérase

### 1.9.1. Extraction d'ADN

C'est un préalable indispensable à l'amplification de l'ADN.

#### Matériel nécessaire :

- Bain à sec à 95°C, 56°C
- Etuve à 37°C
- Centrifugeuse pour microtube de 1.5 ml
- Congélateur -20°C
- Micropipette
- Kit QIAamp DNA mini kit (avec tampon AL, AW1, AW2, AE qu'il faut aliquoter préalablement et protéinase K)
- Microtubes Eppendorfs de 1.5 ml
- Tampon TET + lysosyme conservé au congélateur à -20°C
- Ethanol absolu.

#### Lyse de la cellule et de la membrane nucléaire :

- Pipeter 1ml de chaque échantillon dans des tubes Eppendorfs et numéroter l'échantillon. Il y a donc 42 échantillons et un témoin négatif.
- Centrifuger 10 min à 7500 rotation par minute
- Eliminer le surnageant et suspendre le culot dans 180 µL de tampon TET et lysosyme. Mélanger par aller-retour avec une pipette puis vortexer
- Incuber 30 min à 37°C
- Ajouter 25 µL de protéinase K et 200µL de tampon AL
- Vortexer et incuber 30 min à 56°C dans un bain à sec
- Incuber 15 min à 95°C dans un bain à sec
- Centrifuger rapidement pour faire tomber les gouttes de condensation et ajouter 200µL d'Ethanol absolu

#### Fixation et purification de l'ADN sur colonne :

- Transférer le tout sur une colonne de silice sans toucher le filtre de silice avec la pointe de la micropipette
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 1 minute
- Eliminer le filtrat et transférer la colonne sur un nouveau tube collecteur
- Ajouter 500µL de tampon AW1
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 1 minute
- Eliminer le filtrat et transférer la colonne sur un nouveau tube collecteur
- Ajouter 500µL de tampon AW2
- Centrifuger à 15300 rpm pendant 3 min
- Eliminer le filtrat et transférer la colonne sur un nouveau tube collecteur
- Centrifuger à 15300 pendant 1 minute

#### Elution de l'ADN :

- Placer la colonne sur un tube de 1.5 ml correctement identifié (tube qui contiendra l'ADN à analyser)
- Ajouter 200 µL de tampon AE sur la colonne
- Incuber les tubes fermés 5 min à température ambiante
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 1 min
- Placer les échantillons à -20°C, afin de les conserver jusqu'à la PCR.

#### 1.9.2. Amplification de l'ADN : PCR conventionnelle

La PCR est un processus de synthèse d'ADN.

La première étape est de dénaturer l'ADN à 94°C pendant 30 secondes, ce qui permet d'obtenir des fragments simple brin. Ensuite, une hybridation des brins se met en place avec à une amorce. Enfin, l'ADN est polymérisé à l'aide d'une polymérase.

L'opération se répète et permet une amplification de l'ADN de façon exponentielle.

### Choix des amorces :

Nous avons choisi d'utiliser les dernières amorces scientifiquement fiables dans la littérature.

EGO-1 et EGO-2 ont fait leurs preuves dans trois précédentes études. Nous n'avons en revanche pas la certitude que celles de M. Bonner soient aussi pertinentes étant donné qu'il est le seul à les avoir utilisés.(59)

Ainsi Pour *Entamoeba Gingivalis*, EGO-1 et EGO-2 ont été choisis. Ces amorces amplifient la petite sous unité 18S de l'ADN ribosomal. Elles amplifient l'ADN à partir de 30 cellules d'*Entamoeba Gingivalis*.

Il y a cependant potentiellement un biais car *Entamoeba Gingivalis* possède une variabilité génétique, ce qui pourrait empêcher certaines hybridations avec les amorces choisies.

Pour *Trichomonas Tenax*, TGBK-F et TGBK-R ont été choisis. Ces amorces amplifient également la petite sous unité 18S de l'ADN ribosomal. (46) (47) (60) (61)

Nous avons réalisé une PCR conventionnelle afin de pouvoir détecter une présence/absence et être certain de la non contamination de l'échantillon grâce au marqueur de taille. En effet, lors d'une PCR en temps réel, nous connaissons la quantité d'ADN amplifié mais nous ne serions pas certains de la non contamination car nous n'aurions pas la taille du fragment amplifié.

EGO 1 : 5'-GAATAGGCGCATTTCGAACAGG-3'

EGO 2 : 5'-TCCCACTAGTAAGGTACTACTC-3'

TGBK-F : 5'-AGC AGC TGC GGT AAT TCC AG-3'

TGBK-R : 5'-CTT GTT ACC ACT TCT CCT TCC-3'

Protocole d'amplification :

- Calcul des doses nécessaires de réactifs pour le nombre de réactions qui vont être réalisées (échantillons + 1 témoin négatif d'extraction d'ADN + 1 témoin négatif de PCR + marge d'erreur)

|                |        |
|----------------|--------|
| 10X Pfu buffer | 5 (µL) |
| dNTP           | 1      |
| F primer       | 2      |
| R primer       | 2      |
| Pfu polymérase | 0.5    |
| DNA            | 5      |
| Eau            | 34.5   |
| Volume total   | 50     |

*Figure 30 : Dose de réactifs nécessaire pour une réaction de PCR*

- Préparation des amorces : réhydrater avec de l'eau (dilution pour 10µM)
- Mélanger tous les réactifs :
  - TGBK-F/TGBK-R ou EGO-1/EGO-2
  - dNTP (bases azotés ATCG)
  - Pfu polymérase (plus stable thermiquement que la Taq polymérase, elle présente également une activité exo-nucléase afin d'éliminer les erreurs au cours de la réplication)
  - Tampon (contient des cations servant à maintenir un pH optimal pour l'activité de la Pfu polymérase. Il participe également à la stabilité de l'hybridation en neutralisant les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN)
  - Eau

- Préparer le plan de plaque sur le logiciel ainsi que les températures d'hybridation et les temps de cycle.

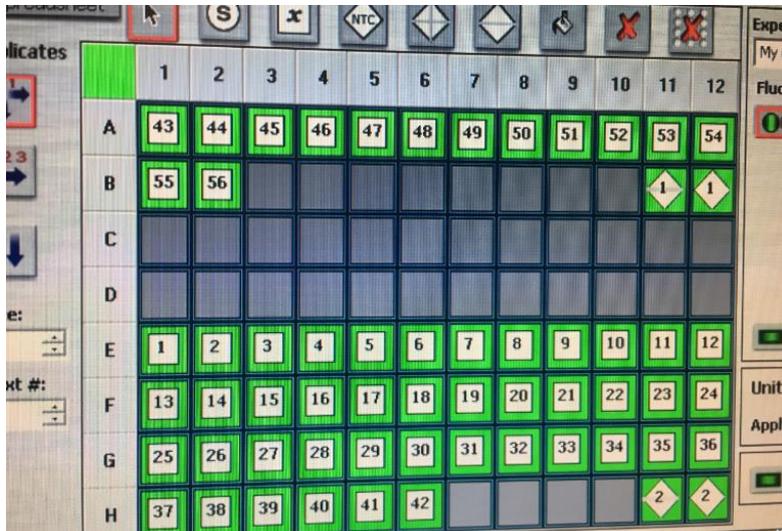


Figure 31 : Plan de la plaque de PCR

| Cycle | 2    |
|-------|------|
| Step  | 2    |
| A     | 60,0 |
| B     | 59,8 |
| C     | 59,2 |
| D     | 58,3 |
| E     | 57,0 |
| F     | 56,1 |
| G     | 55,5 |
| H     | 55,0 |
| Range |      |

Figure 32 : Gradient de température

- Mettre 45  $\mu$ L de mélange sur chaque puit de la plaque de PCR. Le volume réactionnel de la PCR est de 50 $\mu$ L : 45 $\mu$ L de réactifs et 5 $\mu$ L d'ADN extrait. Il faut inclure le témoin négatif d'extraction et le témoin négatif de PCR afin de vérifier qu'il n'y ait pas eu de contamination.
- Mettre un film plastique et centrifuger rapidement pour faire tomber les gouttes
- Activer la PCR après avoir inséré la plaque.

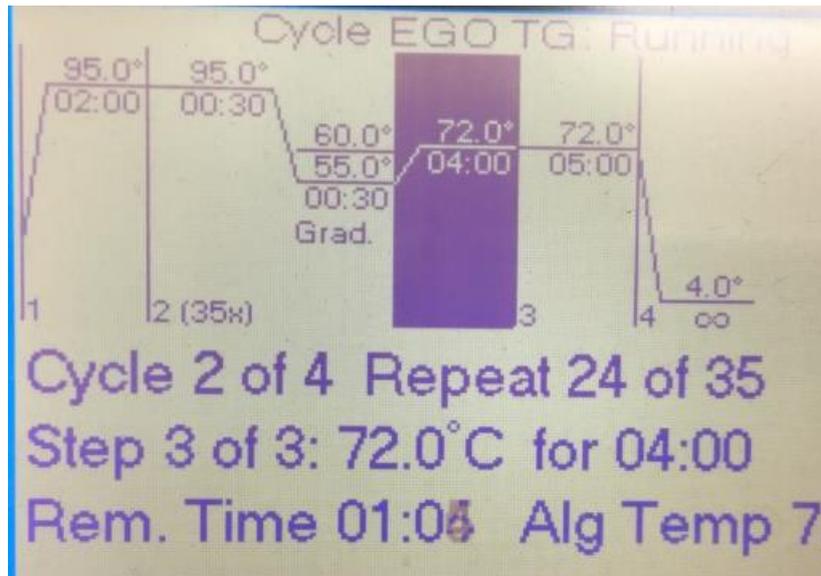


Figure 33 : Cycles de PCR

La PCR commence par une première dénaturation à 95°C pendant 2 minutes. Il y a ensuite 35 cycles divisés en trois étapes : tout d'abord une dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 30 secondes, puis une diminution de la température selon la séquence d'amorce (60°C pour EGO-1 et EGO-2) correspondant à l'hybridation des brins, et enfin une remontée de température à 72°C (température optimale pour la Pfu polymérase) correspondant à la polymérisation. A la fin du 35<sup>ème</sup> cycle, il y a un maintien de la température à 72°C pendant 5 minutes.

### 1.9.3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

#### Matériel nécessaire :

- Balance
- Portoir
- Micropipette
- Four à micro-ondes
- Cuve pour gel
- Lecteur de gel
- Pointes 20µL
- Gants en nitrile
- Scotch
- Parafilm

Réactifs :

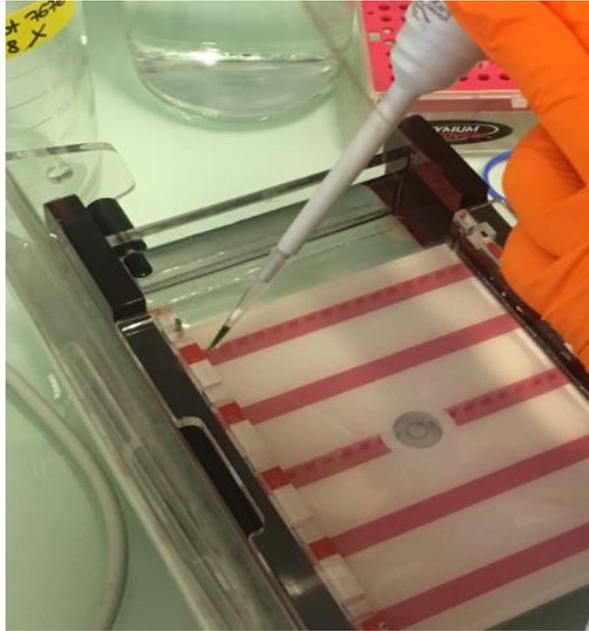
- BET (bromure d'éthydiu)
- Tampon TAE 1X (dilution pas nécessaire)
- Agarose
- Marqueur de taille
- Bleu de charge

Préparation du gel d'agarose :

- Peser la quantité d'agarose de façon à avoir une concentration de 1% : 5g d'agarose pour 500mL de TAE 1X
- Faire fondre au four à micro-onde
- Préparer la cuve en créant des joints étanches avec le scotch et en insérant le peigne
- Couler le gel (environ 5mm d'épaisseur)
- Laisser refroidir et enlever doucement le peigne et les joints
- Mettre le gel dans la cuve et la remplir avec du tampon TAE 1X jusqu'à l'immersion complète des puits. Les puits doivent être du côté de la cathode (le pôle noir).

Dépôt des échantillons :

- Placer les échantillons d'ADN dans la glace
- Mélanger par aller-retour 3  $\mu$ L de bleu de charge avec 17  $\mu$ L d'ADN (15  $\mu$ L lors de l'électrophorèse de *Trichomonas Tenax* pour un volume total de 18  $\mu$ L → le bleu de charge devait être dilué 6 fois) sur un morceau de para film et prélever avec une micropipette. Le cône doit être changé à chaque prélèvement.
- Remplir chaque puit. Ne pas oublier de mettre 17  $\mu$ L (ou 15  $\mu$ L selon le bleu de charge utilisé) de marqueur de taille dans un puit au centre du gel
- Fermer la cuve, brancher les fils et mettre le générateur sous tension
- Laisser migrer (environ 45min) jusqu'à ce que le bleu de charge arrive en bas du gel.



*Figure 34 : Dépôt des échantillons sur le gel d'agarose*

Révélation :

- Transférer le gel dans un bain de BET (eau distillé et une goutte de BET)
- Laisser agir 15min
- Poser le gel sur le plateau de lecture du gel et effectuer l'analyse du gel avec le lecteur. La photographie du gel apparaît sur le logiciel.

## 2. Résultats

### 2.1. Identification bactérienne et parasitaire

Les bactéries ont donc été identifiées par spectrométrie de masse, couplé ou non avec le test rapid id 32a.

D'autres bactéries ont été identifiées, nous avons choisi de mentionner uniquement les bactéries ayant un rôle avéré dans l'étiologie bactérienne de la parodontite.

|    | Echantillon 1   | Echantillon 2   |
|----|---|---|
| P1 | - <i>porphyromonas gingivalis</i>   | - <i>parvimonas micra</i><br>- <i>prevotella oralis</i><br>- <i>Campylobacter ureolyticus</i><br>- <i>prevotella loescheii</i><br>- <i>prevotella buccalis</i><br>- <i>porphyromonas gingivalis</i> |
| P2 | - <i>prevotella intermedia</i><br>- <i>fusobacterium nucleatum</i>                              | - <i>porphyromonas gingivalis</i><br>- <i>Fusobacterium nucleatum</i><br>- <i>prevotella dentalis</i>   |
| P3 | - <i>porphyromonas gingivalis</i>   | - <i>porphyromonas gingivalis</i><br>- <i>prevotella</i><br>- <i>actinomyces odontolyticus</i>  |
| P4 | - <i>prevotella nigrescens</i><br>- <i>parvimonas micra</i><br>- <i>fusobacterium nucleatum</i> | - <i>prevotella nigrescens</i>  |
| P5 | - <i>prevotella sp.</i><br>- <i>prevotella dentalis</i><br>- <i>fusobacterium nucleatum</i>     | - <i>actinomyces odontolyticus</i>  |

|     |   |  |
|-----|---|--|
| P6  | - <i>Veillonella parvula</i><br>- <i>Fusobacterium nucleatum</i>  | - <i>parvimonas micra</i>                                      |
| P7  | - <i>Streptococcus constellatus</i><br>- <i>Parvimonas micras</i><br>- <i>Fusobacterium sp</i><br>- <i>Porphyromonas gingivalis</i><br>- <i>Prevotella dentalis</i> | - <i>Porphyromonas gingivalis</i>                              |
| P8  | - <i>Veillonella parvula</i>  | - <i>Prevotella melaninogenica</i>                             |
| P9  |   | - <i>Prevotella intermedia</i>                                 |
| P10 | - <i>Parvimonas micras</i><br>- <i>Fusobacterium nucleatum</i>  |  |
| P11 | - <i>Prevotella intermedia</i>  | - <i>Fusobacterium nucleatum</i>                               |
| P12 | - <i>Porphyromonas gingivalis</i>   | - <i>Porphyromonas gingivalis</i>                              |
| P13 | - <i>Porphyromonas gingivalis</i><br>- <i>Actinomyces naeslundii</i><br>- <i>Fusobacterium nucleatum</i>  | - <i>Porphyromonas gingivalis</i>                              |
| P14 | - <i>Porphyromonas gingivalis</i>   |  |
| P15 | - <i>Streptococcus constellatus</i>   |  |
| P16 | - <i>Actinomyces naeslundii</i>   |  |
| P17 | - <i>Porphyromonas gingivalis</i><br>- <i>Parvimonas micra</i>  | - <i>Fusobacterium sp</i><br>- <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
| P18 | - <i>Actinomyces naeslundii</i>   | - <i>Actinomyces naeslundii</i>                                |
| P19 |   |  |

|     |                              |   |
|-----|------------------------------|---|
| P20 |                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Prevotella dentalis</i></li> <li>- <i>Porphyromonas gingivalis</i></li> </ul> |
| P21 | - <i>Prevotella loeschii</i> | - <i>Fusobacterium nucleatum</i>  |

Figure 35 : Tableau d'identification des bactéries et des parasites



Positif pour *Trichomonas Tenax*



Positif pour *Entamoeba Gingivalis*

Certains échantillons n'ont pas été concluants dans l'identification bactérienne. Cela peut s'expliquer par un défaut dans le protocole, en particulier lors de l'identification par spectrométrie de masse qui n'a pas été concluante.

Nous pouvons également penser que certaines bactéries de ces échantillons n'étaient pas cultivées dans un milieu approprié, en particulier *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella Forsythia* et *Treponema denticola*.

La culture aurait probablement été possible dans un milieu sélectif : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pousse dans une gélose Trypticase soja et *Treponema denticola* pousse dans un bouillon infusion cœur-cervele.

## 2.2. Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose après PCR conventionnelle

### 2.2.1. Amorces EGO-1 et EGO-2 :

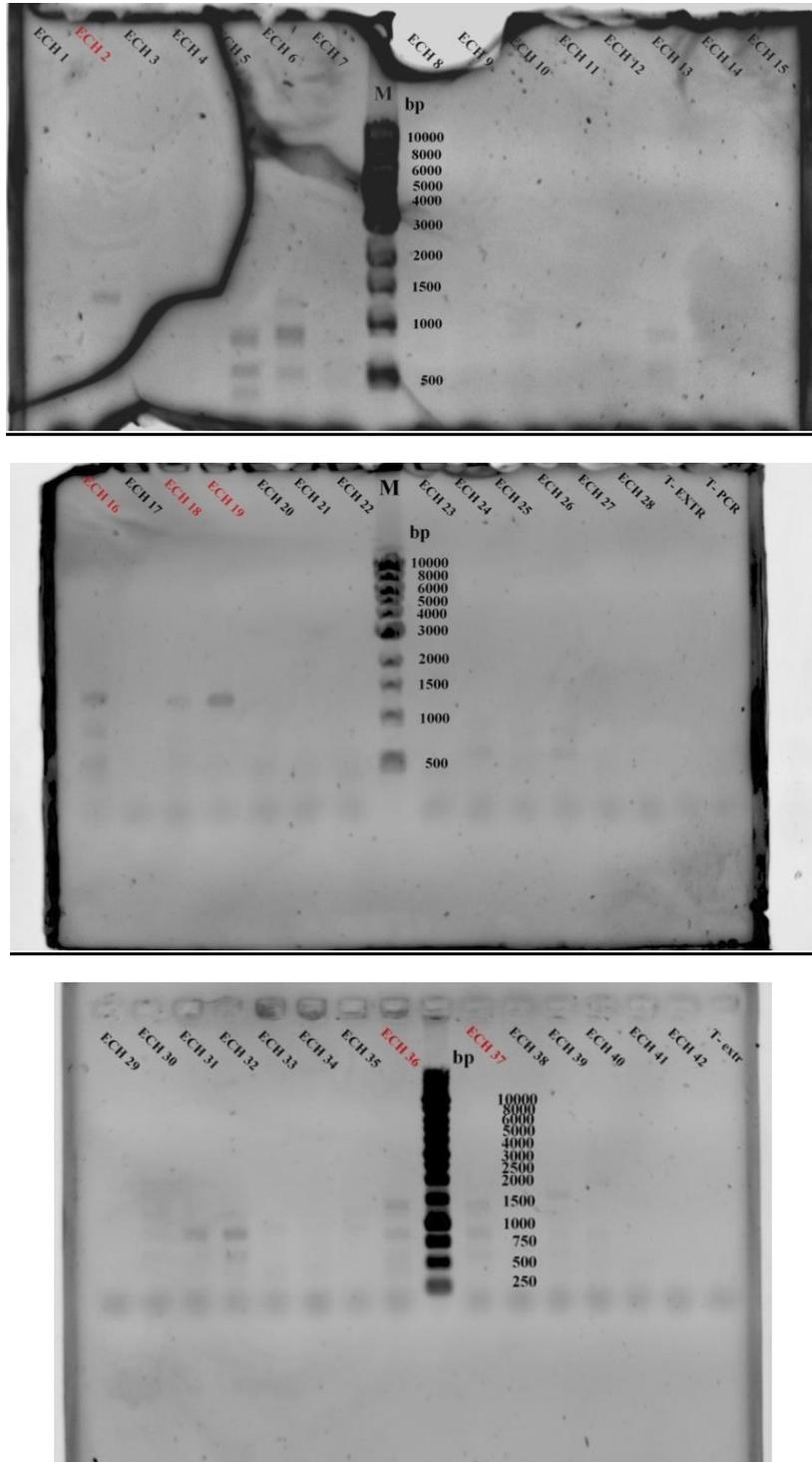


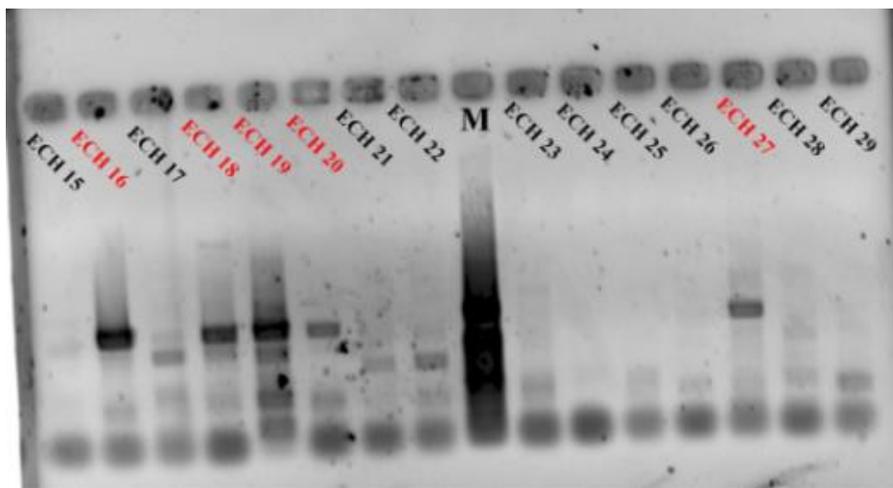
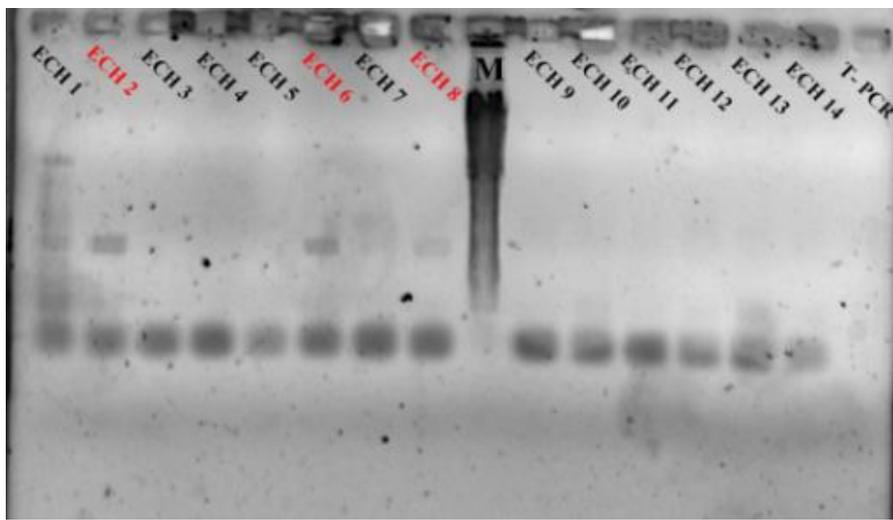
Figure 36 : Lecture du gel d'agarose montrant une amplification de 1400 pb pour l'échantillon 2, 16, 18, 19, 36, 37.

Chaque amplification de 1400 paires de bases a été considérée comme positive pour *Entamoeba Gingivalis*.

**Nous avons 6 échantillons positifs sur 42 échantillons prélevés. *Entamoeba Gingivalis* a donc une prévalence de 14.28%.**

Quatre patients sur 21 sont positifs pour au moins un échantillon. De plus, deux des patients sont positifs pour les deux échantillons. Nous avons donc 19% de patient positifs pour *Entamoeba Gingivalis*.

### 2.2.2. Amorces TGBK-F et TGBK-R



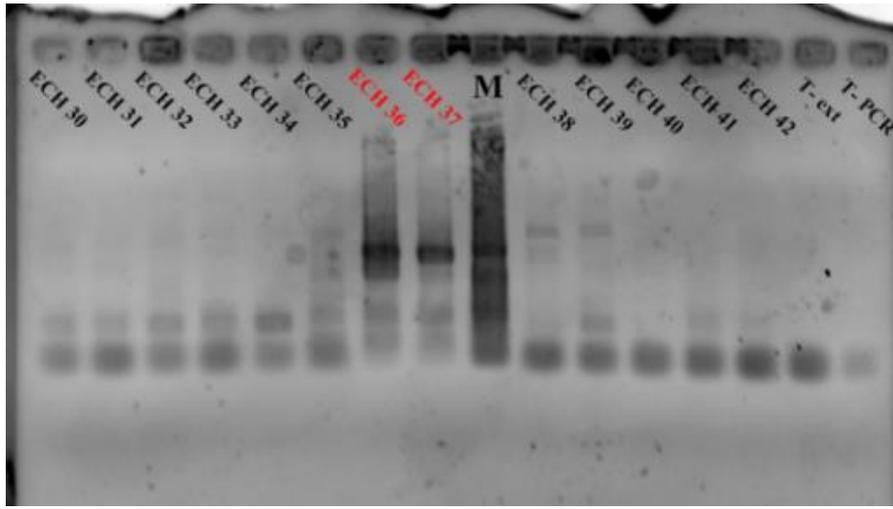


Figure 37 : Lecture du gel montrant une probable amplification de 1054 pb des échantillons 2, 6, 8, 16, 18, 19, 20, 27, 36 et 37

Sur cette électrophorèse, le marqueur de taille n'apparaît pas avec clarté. Nous avons donc sélectionné les échantillons positifs selon une migration qui nous paraissait cohérente.

**Nous obtenons 10 échantillons positifs sur 42, et donc une prévalence 23,8 % pour *Trichomonas Tenax*.**

7 patients sont positifs pour au moins un échantillon. De plus trois patients sont positifs pour les deux échantillons. Il y a donc 33% de patients positifs pour *Trichomonas Tenax*.

**Tous les échantillons positifs pour *Entamoeba Gingivalis* sont également positifs pour *Trichomonas Tenax*. Nous avons donc une prévalence pour les deux parasites de 23,8%.**

### 2.3. Complexes bactériens en fonction de la présence d'*Entamoeba Gingivalis* et de *Trichomonas Tenax*

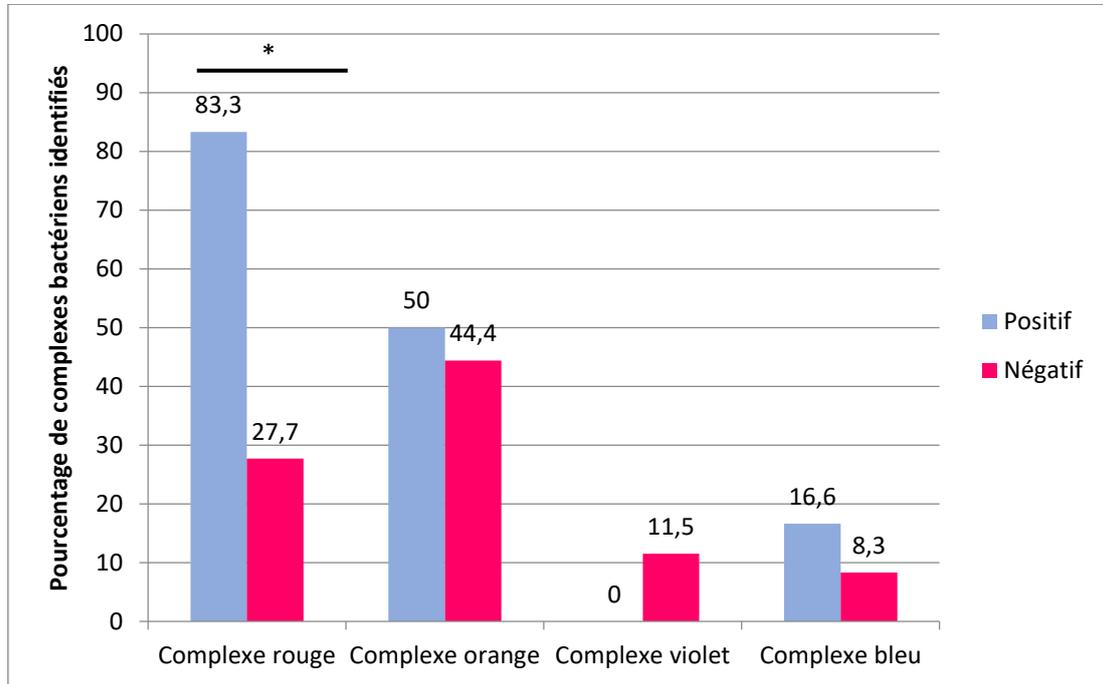


Figure 38 : Complexes bactériens en fonction de la présence d'*Entamoeba Gingivalis*

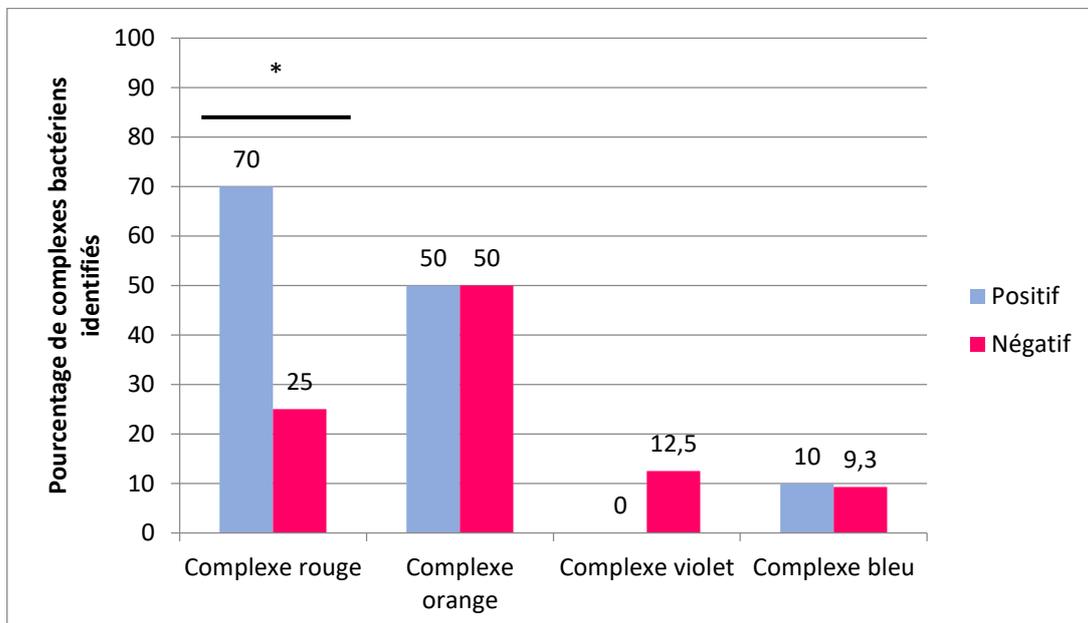


Figure 39: Complexes bactériens en fonction de la présence de *Trichomonas Tenax*

Nous avons utilisé le test du Chi 2 pour analyser ces données.

**Les bactéries du complexe rouge ont une prévalence significativement plus élevée lorsqu'*Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas Tenax* sont présents dans les échantillons ( $p=0.008$  pour *Entamoeba Gingivalis* et  $p=0,009547$  pour *Trichomonas Tenax*).**

En effet, le complexe rouge représenté par *Porphyromonas gingivalis* est présent à 83% et 70 % dans les échantillons positifs respectivement pour *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax* alors qu'il n'est présent qu'à 27.7% et 25% dans les échantillons négatifs.

Le complexe bleu est représenté par *Actinomyces naeslundii*.

Le complexe violet est représenté par *Veillonella Parvula* et *Actinomyces odontolyticus*.

Le complexe orange est représenté par *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium Nucleatum*, *Campylobacter*, *Parvimonas Micra* et *Streptococcus Constellatus*.

**Il n'y pas de différence significative de prévalence de ces complexes entre les échantillons positifs pour *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax* et les échantillons négatifs (complexe bleu  $p=1$ , complexe violet  $p=10.9$ , complexe orange  $p=1$  pour *Entamoeba Gingivalis* et complexe bleu  $p=1$ , complexe violet  $p=0.8927$ , complexe orange  $p=1$  pour *Trichomonas Tenax*).**

Nous précisons que nous avons étudié seulement les bactéries que nous avons réussi à cultiver. Il est tout à fait possible que d'autres bactéries appartenant à ces complexes ai été présente mais non identifiées.

### 2.3.1. Profondeur de poche des échantillons selon la présence d'Entamoeba Gingivalis et de Trichomonas Tenax

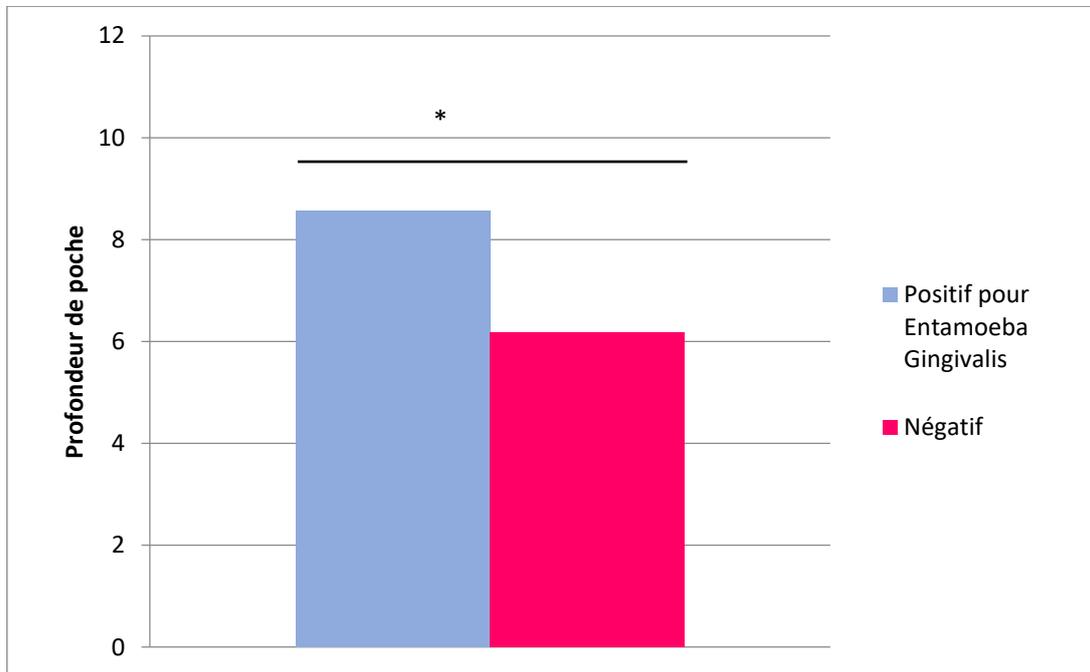


Figure 40 : Moyennes des profondeurs de poche en fonction de la présence d'Entamoeba Gingivalis

5 sur 6 échantillons positifs pour *Entamoeba Gingivalis* (83.3%) ont une profondeur de poche  $\geq 7$  mm (on considère que la parodontite est sévère lorsque la profondeur de poche est  $\geq 7$  mm).

7 sur 25 échantillons négatifs sont associés à une poche  $\geq 7$ mm.

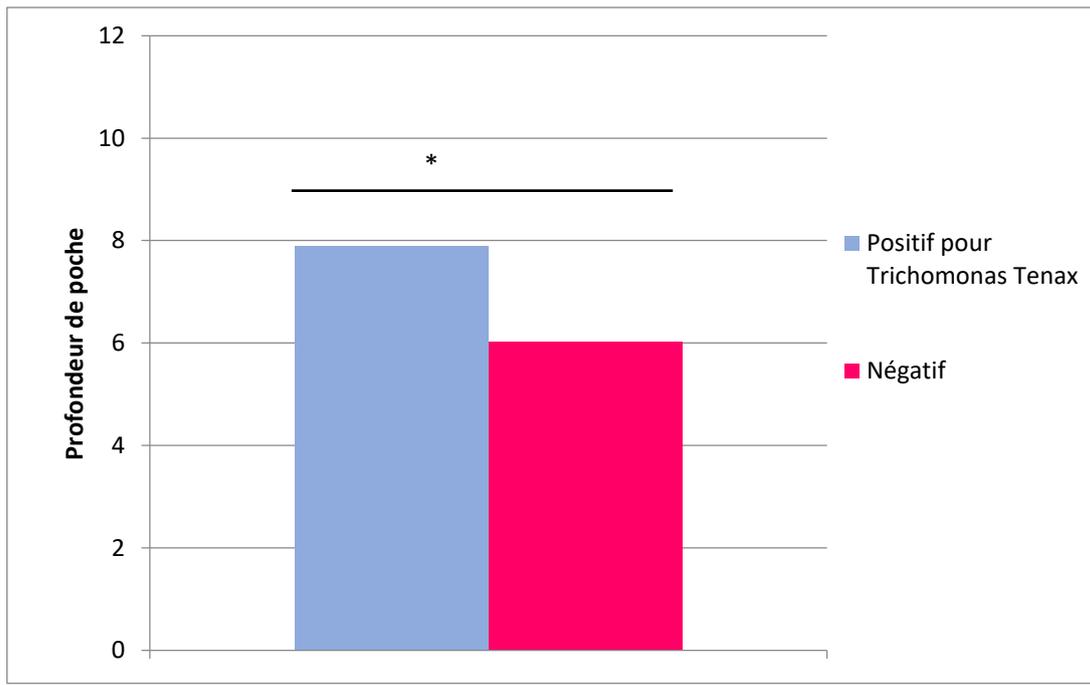


Figure 41: Moyenne des profondeurs de poches en fonction de la présence de *Trichomonas Tenax*

7 sur 10 échantillons positifs pour *Trichomonas Tenax* ont une profondeur de poche  $\geq$  7mm (70%).

10 sur 32 échantillons négatifs ont une profondeur de poche  $\geq$  7mm (31.25%).

**Nous avons réalisé un test de moyennes avec le Test de Student.**

**Nous pouvons donc affirmer que la profondeur de poche des échantillons positifs pour *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax* est significativement plus importante que la profondeur de poche des échantillons négatifs ( $p= 0,04759$  pour *Entamoeba Gingivalis* et  $p= 0,03097$  pour *Trichomonas Tenax*).**

Nous devons cependant souligner que l'échantillon avec la plus grande profondeur de poche (12 mm) s'est avéré négatif pour les deux parasites.

### 3. Discussion

#### Prévalence d'*Entamoeba gingivalis*

En 1996, Kikuta a effectué des prélèvements sur 8 patients avec 32 échantillons au total. Il a obtenu une prévalence de 6.25 % pour *Entamoeba Gingivalis*. (60)

En 2011, Trim a obtenu une prévalence de 27 % sur des prélèvements de 26 patients.(47)

En 2013, Cembranelli a effectué des prélèvements sur 82 patients positifs pour le HIV. Il a obtenu une prévalence d'*Entamoeba Gingivalis* de 56.1 % chez les patients HIV+ et 27 % chez les patients HIV-. (46)

Ces trois études ont identifié le parasite au moyen d'une PCR conventionnelle avec les mêmes amorces (EGO-1 et EGO-2).

**Nous avons-nous même obtenu dans la présente étude 14,28 % de prévalence sur 42 échantillons.**

Cela semble se rapprocher de ces trois autres études, bien que la comparaison soit assez subjective du fait de leurs conditions de prélèvement, d'identification et du nombre d'échantillons différents.

Cembranelli a obtenu une prévalence légèrement plus élevée chez les patients HIV positifs. Il l'explique par une comorbidité, notamment par une hypercholestérolémie possible du au traitement HAART que tous les patients de l'étude ont reçus. Or, le cholestérol est un élément nécessaire à la croissance in vitro et au maintien des facteurs de virulence de l'espèce *Entamoeba*.

Nous n'avons cependant pas obtenu une prévalence aussi élevée que celle de M. Bonner dans son étude de 2014. En effet, il a obtenu une prévalence de 68.6 % chez 72 patients. (59)

Cette grande différence de résultat pourrait s'expliquer tout d'abord par une discordance d'amorces utilisées avec toutes les autres études. Ce jeu d'amorce est dogmatique compte tenu de son faible niveau de preuve scientifique.

De plus, son milieu de dispersion est la salive. Or, la littérature nous montre que des cellules d'*Entamoeba Gingivalis* peuvent se retrouver dans la cavité orale et donc dans la salive, que le patient soit sain ou atteint de parodontite sans être obligatoirement dans les poches. Ceci biaise donc ses résultats de présence ou non du parasite dans les poches parodontales.

### Prévalence de *Trichomonas Tenax*

Trois études ont déjà réalisé une PCR pour identifier ce parasite.

En 1997, Kikuta a réalisé une PCR avec un autre jeu d'amorce que celui utilisé dans notre étude (PT3 et PT7) et obtenu une prévalence de 55,6 % sur 9 patients atteints de parodontite ou de gingivite. (62)

En 2007, Athari a obtenu une prévalence de 20,6 % avec les mêmes amorces. Il a tout comme nous réalisé des prélèvements dans les poches parodontales.(61)

En 2015, Mehr a obtenu une prévalence de 26,9 % avec également les mêmes amorces.(63)

**Nous avons nous même obtenu une prévalence de 23,8 % pour *Trichomonas Tenax*, ce qui semble se rapprocher de la prévalence obtenue dans l'étude d'Athari et de Mehr.**

Aucun auteur n'a à ce jour réalisé de PCR pour identifier à la fois *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax* provenant des mêmes échantillons. Nous n'avons donc aucun point de comparaison d'étude avec exactement les mêmes conditions de prélèvement, d'extraction d'ADN et de PCR pour les deux parasites.

**C'est le cas dans notre étude et nous pouvons donc comparer la prévalence de chaque parasite. Ainsi, nous observons que la prévalence de *Trichomonas Tenax* est plus élevée (23,8 %) que celle d'*Entamoeba Gingivalis* (14.28 %).**

**Cela conforte notre hypothèse selon laquelle il y aurait un lien entre l'infestation par *Trichomonas Tenax*, *Entamoeba Gingivalis* et la parodontite.**

### Interactions entre les bactéries et les parasites

**Nous avons une proportion significativement plus importante de *Porphyromonas Gingivalis* dans les échantillons positifs pour *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax*.**

**Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle *Entamoeba Gingivalis*, *Trichomonas Tenax* et le complexe rouge fonctionnent en synergie et ont des interactions positives entre eux, en termes de croissance ou de virulence.**

**On peut également penser que le milieu anaérobie strict dans lequel évolue *Porphyromonas Gingivalis* est propice au développement des parasites oraux.**

### Profondeur de poche

**La profondeur de poche des échantillons positifs est significativement plus importante que celle des échantillons négatifs.**

**Les résultats obtenus nous permettent de déduire qu'il est possible qu'*Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax* jouent un rôle dans la sévérité ou l'aggravation de la parodontite.**

Ceci pourrait être associé à une participation du parasite dans le dysfonctionnement de la réponse immunitaire de l'hôte.

En effet, *Entamoeba gingivalis* peut hémolyser les leucocytes et est capable de phagocyter les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes T et les macrophages.

*Trichomonas Tenax*, tout comme *Trichomonas Vaginalis* pourrait moduler la réponse immunitaire en dégradant les IgM, IgG et IgA, et en stimulant l'IL-8. (64)

Ainsi, les patients infectés par les parasites auraient une réponse immunitaire diminuée et donc une destruction tissulaire et une perte d'attache plus importante.

Nous pouvons également penser, de par les résultats des associations bactériennes avec le parasite, qu'*Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax* auraient des interactions positives avec *Porphyromonas Gingivalis* et augmenteraient également la profondeur de la poche et ainsi de la perte d'attache. Le patient serait ainsi atteint d'une parodontite plus sévère.

### Relation entre Age/Tabac, *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax*

Les résultats sont totalement discordants, nous n'avons pas observé de relation significative entre l'âge, *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax*. Il en est de même avec le tabac.

Ces résultats n'écartent pas non plus la possibilité que ce parasite soit un organisme commensal profitant du milieu anaérobie, riche en polynucléaires neutrophiles, leucocytes, bactéries et en hématies pour se développer, sans pour autant avoir un rôle dans la progression de la maladie.

## CONCLUSION

Outre l'étiologie bactérienne qui a été validée par la littérature scientifique, la possibilité d'une étiologie parasitaire reste à approfondir.

Ces parasites sont retrouvés dans cette étude à 14,28 % pour *Entamoeba Gingivalis* et à 23,8 % pour *Trichomonas Tenax* dans les poches parodontales.

La présence de *Porphyromonas Gingivalis* est significativement plus importante chez les patients infectés par les parasites.

Les poches sont significativement plus profondes lorsqu'*Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax* sont présents.

En revanche, la relation entre l'âge, le tabac et les parasites est non significative.

Il n'est donc clairement pas nécessaire d'être infecté par ces parasites pour être atteint de parodontite, mais cela n'exclue tout de même pas la possibilité que ce parasite joue un rôle dans l'étiopathogénie parodontale. L'échantillon négatif ayant une profondeur de poche de 12 mm nous l'illustre bien.

Il y a donc deux hypothèses qui s'offrent à nous :

- Les parasites auraient une synergie de virulence avec les bactéries parodontopathogènes, et participeraient au dérèglement de la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui entraînerait une aggravation de la parodontite chez les patients infectés par ce parasite.
- Ce ne serait que des commensaux opportunistes qui profiteraient de l'environnement pathologique pour se développer, sans pour autant jouer un rôle déterminant dans la parodontite.

Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives, les parasites pourraient être pathogènes, tout en profitant de l'environnement local de la parodontite pour se développer.

Dans notre étude, nous n'avons pas inclus des patients sains car cela a déjà été réalisé dans les autres études, qui ont montré que les parasites étaient présents, en plus faible quantité, dans la cavité orale.

Nous avons utilisé une PCR conventionnelle pour étudier la prévalence des deux parasites. Dans son étude, Trim a comparé la PCR conventionnelle avec la PCR à temps réel et a montré qu'il y avait une plus grande sensibilité avec cette dernière (7 sujets positifs avec la PCR conventionnelle / 18 sujets positifs avec la PCR à temps réel).

A l'avenir, une PCR à temps réel pourra donc être préférée. Cela nous permettra également de faire un dosage quantitatif des parasites.

Afin d'obtenir une identification bactérienne plus fiable avec une plus grande diversité d'espèces bactériennes identifiées, une PCR serait plus appropriée.

Il serait important de pouvoir mettre en culture ces parasites. Dans son étude, Cembranelli a proposé un protocole de culture pour *Entamoeba Gingivalis* : 37 échantillons sur 82 ont survécu. Süleyman Yazar a proposé une culture de *Trichomonas Tenax* avec un milieu Trypticase-extrait de levure-maltose (TYM).

Cela nous permettrait d'étudier les types d'interactions avec les bactéries parodontopathogènes, en particulier *Porphyromonas Gingivalis*, et les facteurs de virulence comme les capacités d'adhérence, la production de cystéines protéases, la capacité de phagocytose des PMN et la cytotoxicité pour les cellules immunitaires.

Il serait également intéressant, après les avoir mis en culture, de mettre en place un protocole animal murin. Une introduction de parasites dans des poches parodontales de rat nous permettrait d'observer et de comparer la destruction tissulaire entre les deux groupes de souris (étude cas/témoin).

Tout ceci nous permettra de valider ou non les postulats de Koch révisés par Socransky.

Seul le deuxième postulat « l'élimination de l'agent pathogène entraîne une rémission des signes cliniques » est difficile à prouver. En effet, le Métronidazole prescrit aux patients est un antiparasitaire pouvant éliminer les deux protozoaires, mais également un antibiotique éliminant les bactéries pathogènes.

Il est donc impossible d'affirmer que la stabilisation de la parodontite est due à l'élimination des parasites.

Une étude plus approfondie semble donc nécessaire pour nous éclairer sur le rôle potentiel de ces parasites. Cela nous permettrait ainsi d'avoir une meilleure compréhension de l'étiopathogénie parodontale, pas entièrement élucidée à ce jour.

Vu le directeur de  
Hise  
le 3. V 2018  


Vu, le Président du Jury  
  
le 03/05/18

## Table des illustrations

|   |    |
|---|----|
| <i>Figure 1: Structure du Lipopolysaccharide Acide</i> .....  | 18 |
| <i>Figure 2 : Postulats de Koch révisés par Socransky, 1992 (4)</i> .....   | 21 |
| <i>Figure 3 : Colonie de Porphyromonas Gingivalis à pigmentation noire sur gélose au sang</i> .....   | 23 |
| <i>Figure 4 : Porphyromonas Gingivalis observé sous microscope optique grossissement x100</i> .....   | 23 |
| <i>Figure 5 : Fimbriae sous microscope à contraste de phase, La flèche montre les fimbriae, appendices filamenteux sur la surface de la membrane externe.</i> .....   | 24 |
| <i>Figure 6 : Vésicules de Porphyromonas Gingivalis au microscope électronique à transmission. (11)</i> ..  | 26 |
| <i>Figure 7 : Tannerella forsythia sur gélose au sang (13)</i> .....  | 27 |
| <i>Figure 8 : Coloration au Gram de Tannerella Forsythia</i> .....  | 27 |
| <i>Figure 9 : Tannerella forsythia au microscope électronique(14)</i> .....   | 27 |
| <i>Figure 10 : (A) Treponema denticola sur microscope électronique à transmission. Les flèches montrent les faisceaux d'endo-flagelles.</i> .....   | 29 |
| <i>Figure 11 : (B) Micrographies électronique Treponema denticola</i> .....   | 29 |
| <i>Figure 12: Prevotella intermedia sur gélose au sang</i> .....  | 31 |
| <i>Figure 13 : Prevotella intermedia au microscope électronique (Takeshi Yamanaka)</i> .....  | 31 |
| <i>Figure 14 : Structure en étoile d'Aa (Jeffrey B. Kaplan)</i> .....   | 32 |
| <i>Figure 15 : Fusobacterium Nucleatum sur gélose au sang</i> .....   | 33 |
| <i>Figure 16 : Coloration de Gram de Fusobacterium nucléatum</i> .....  | 34 |
| <i>Figure 17 : Fusobactérium au microscope électronique. (B) et (C) les flèches montrent la membrane externe (OM), l'espace périplasmique (P) et la membrane interne (CM).</i> .....  | 34 |
| <i>Figure 18 : Campylobacter rectus au microscope électronique, la flèche montre le flagelle (Nadeem Omar Kaakoush and Hazel Marjory Mitchell, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, The University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia).</i> ..... | 35 |
| <i>Figure 19 : Organisation du biofilm oral</i> .....   | 37 |
| <i>Figure 20 : classification des bactéries en complexes selon Socransky</i> .....  | 39 |
| <i>Figure 21 : Relation phylogénétique d'Entamoeba Gingivalis chez des patients atteints de HIV, Sibeli B. S. Cembranelli, 2013 (46).</i> .....   | 43 |
| <i>Figure 22 : quadrillage et numérotation des géloses</i> .....  | 63 |
| <i>Figure 23 : schéma d'une lame de verre avant observation au microscope</i> .....   | 64 |
| <i>Figure 24 : Coloration de Gram</i> .....   | 64 |
| <i>Figure 25 : Gélose après incubation</i> .....  | 65 |
| <i>Figure 26 : Test rapid id 32 A</i> .....   | 67 |
| <i>Figure 27 : Plaque de spectrométrie</i> .....  | 68 |
| <i>Figure 28 : Plan de plaque</i> .....   | 69 |
| <i>Figure 29 : Spectromètre de masse</i> .....  | 69 |
| <i>Figure 30 : Dose de réactifs nécessaire pour une réaction de PCR</i> .....   | 77 |
| <i>Figure 31 : Plan de la plaque de PCR</i> .....   | 78 |
| <i>Figure 32 : Gradient de température</i> .....  | 78 |
| <i>Figure 33 : Cycles de PCR</i> .....  | 79 |
| <i>Figure 34 : Dépôt des échantillons sur le gel d'agarose</i> .....  | 81 |

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Figure 35 : Tableau d'identification des bactéries et des parasites .....</i>  | <i>84</i> |
| <i>Figure 36 : Lecture du gel d'agarose montrant une amplification de 1400 pb pour l'échantillon 2, 16, 18, 19, 36, 37. ....</i>              | <i>85</i> |
| <i>Figure 37 : Lecture du gel montrant une probable amplification de 1054 pb des échantillons 2, 6, 8, 16, 18, 19, 20, 27, 36 et 37 .....</i> | <i>87</i> |
| <i>Figure 38 : Complexes bactériens en fonction de la présence d'Entamoeba Gingivalis.....</i>  | <i>88</i> |
| <i>Figure 39: Complexes bactériens en fonction de la présence de Trichomonas Tenax.....</i>   | <i>88</i> |
| <i>Figure 40 : Moyennes des profondeurs de poche en fonction de la présence d'Entamoeba Gingivalis</i>  | <i>90</i> |
| <i>Figure 41: Moyenne des profondeurs de poches en fonction de la présence de Trichomonas Tenax ..</i>  | <i>91</i> |

## Bibliographie

1. Amoureux M-C. Rôle pathophysiologique des endotoxines, un dénominateur commun dans différentes maladies. 27 juill 2010;
2. Jain S, Darveau RP. Contribution of Porphyromonas gingivalis lipopolysachharide to periodontitis. *Periodontol 2000*. oct 2010;54(1):53-70.
3. Bullon P, Cordero MD, Quiles JL, Ramirez-Tortosa M del C, Gonzalez-Alonso A, Alfonsi S, et al. Autophagy in periodontitis patients and gingival fibroblasts: unraveling the link between chronic diseases and inflammation. *BMC Med*. 17 oct 2012;10:122.
4. How KY, Song KP, Chan KG. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol* [Internet]. 9 févr 2016 [cité 10 févr 2017];7.
5. Lynch MC, Kuramitsu HK. Role of Superoxide Dismutase Activity in the Physiology of Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun*. juill 1999;67(7):3367-75.
6. Andrade JA de, Feres M, Figueiredo LC de, Salvador SL, Cortelli SC. The ability of the BANA test to detect different levels of P. gingivalis, T. denticola and T. forsythia. *Braz Oral Res*. juin 2010;24(2):224-30.
7. Enersen M, Nakano K, Amano A. Porphyromonas gingivalis fimbriae. *J Oral Microbiol* [Internet]. 6 mai 2013 [cité 11 févr 2017];5.
8. Singh A, Wyant T, Anaya-Bergman C, Aduse-Opoku J, Brunner J, Laine ML, et al. The Capsule of Porphyromonas gingivalis Leads to a Reduction in the Host Inflammatory Response, Evasion of Phagocytosis, and Increase in Virulence ▽. *Infect Immun*. nov 2011;79(11):4533-42.
9. Chen T, Nakayama K, Belliveau L, Duncan MJ. Porphyromonas gingivalis gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect Immun*. mai 2001;69(5):3048-56.
10. Wilensky A, Tzsch-Nahman R, Potempa J, Shapira L, Nussbaum G. Porphyromonas gingivalis gingipains selectively reduce CD14 expression, leading to macrophage hyporesponsiveness to bacterial infection. *J Innate Immun*. 2015;7(2):127-35.
11. Xie H. Biogenesis and function of Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles. *Future Microbiol*. sept 2015;10:1517-27.
12. Tanner ACR, Listgarten MA, Ebersole JL, Strzempko MN. Bacteroides forsythus sp. nov., a Slow-Growing, Fusiform Bacteroides sp. from the Human Oral Cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1986;36(2):213-21.
13. Grenier D. Characterization of the trypsin-like activity of Bacteroides forsythus. *Microbiology*. 1995;141(4):921-6.
14. Sharma A. Virulence mechanisms of Tannerella forsythia. *Periodontol 2000*. oct 2010;54(1):106-16.

15. Sabet M, Lee S-W, Nauman RK, Sims T, Um H-S. The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology*. 2003;149(12):3617-27.
16. Shimotahira N, Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Yamada S, Fukutsuji K, Nagano K, et al. The Surface Layer of *Tannerella forsythia* Contributes to Serum Resistance and Oral Bacterial Coaggregation. *Infect Immun*. avr 2013;81(4):1198-206.
17. Onishi S, Honma K, Liang S, Stathopoulou P, Kinane D, Hajishengallis G, et al. Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by the *Tannerella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. *Infect Immun*. janv 2008;76(1):198-205.
18. Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, et al. Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infect Immun*. mars 2004;72(3):1318-25.
19. Hamlet SM, Ganashan N, Cullinan MP, Westerman B, Palmer JE, Seymour GJ. A 5-year longitudinal study of *Tannerella forsythia* prTH genotype: association with loss of attachment. *J Periodontol*. janv 2008;79(1):144-9.
20. Ikegami A, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK. Multiple Functions of the Leucine-Rich Repeat Protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect Immun*. août 2004;72(8):4619-27.
21. Chi B, Qi M, Kuramitsu HK. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Res Microbiol*. nov 2003;154(9):637-43.
22. Bamford CV, Fenno JC, Jenkinson HF, Dymock D. The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. *Infect Immun*. sept 2007;75(9):4364-72.
23. Brissette CA, Lukehart SA. *Treponema denticola* is resistant to human beta-defensins. *Infect Immun*. juill 2002;70(7):3982-4.
24. Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen K-A, Wawrzonek K, Manandhar SP, et al. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. *PLoS Pathog*. févr 2009;5(2):e1000316.
25. Tan KS, Song K-P, Ong G. Cytotoxic distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*. 1 août 2002;37(4):268-72.
26. Akifusa S, Poole S, Lewthwaite J, Henderson B, Nair SP. Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Cytotoxic Distending Toxin Proteins Are Required To Interact To Inhibit Human Cell Cycle Progression and To Stimulate Human Leukocyte Cytokine Synthesis. *Infect Immun*. 1 sept 2001;69(9):5925-30.
27. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev*. janv 1996;9(1):55-71.
28. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol*. févr 2015;0:141-7.
29. Rams TE, Feik D, Slots J. *Campylobacter rectus* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1 août 1993;8(4):230-5.

30. Gillespie J, De Nardin E, Radel S, Kuracina J, Smutko J, Zambon JJ. Production of an extracellular toxin by the oral pathogen *Campylobacter rectus*. *Microb Pathog.* 1 janv 1992;12(1):69-77.
31. Rams TE, Feik D, Listgarten MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* févr 1992;7(1):1-6.
32. Mühlhauser M. [*Eikenella corrodens*]. *Rev Chil Infectologia Organo Of Soc Chil Infectologia.* avr 2013;30(2):163-4.
33. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res.* avr 2014;78(2):110-6.
34. Mahajan A, Singh B, Kashyap D, Kumar A, Mahajan P. Interspecies Communication and Periodontal Disease. *Sci World J.* 10 déc 2013 [cité 17 avr 2017];2013.
35. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011;2(5):435-44.
36. Socransky S s., Haffajee A d., Cugini M a., Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1 févr 1998;25(2):134-44.
37. Zhu C, Li F, Wong MCM, Feng X-P, Lu H-X, Xu W. Association between Herpesviruses and Chronic Periodontitis: A Meta-Analysis Based on Case-Control Studies. *PloS One.* 2015;10(12):e0144319.
38. Alzahrani AA. Association between human herpes virus and aggressive periodontitis: A systematic review. *Saudi J Dent Res.* janv 2017;8(1–2):97-104.
39. Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res.* juin 2008;43(3):352-9.
40. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontal Res.* févr 2000;35(1):3-16.
41. Teughels W, Sliepen I, Quirynen M, Haake SK, Van Eldere J, Fives-Taylor P, et al. Human cytomegalovirus enhances *A. actinomycetemcomitans* adherence to cells. *J Dent Res.* févr 2007;86(2):175-80.
42. Slots J, Contreras A. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? *Mol Oral Microbiol.* 1 oct 2000;15(5):277-80.
43. Jian B, Kolansky AS, Baloach ZW, Gupta PK. *Entamoeba gingivalis* pulmonary abscess - diagnosed by fine needle aspiration. *CytoJournal.* 30 sept 2008;5:12.
44. Rashidi Maybodi F, Haerian Ardakani A, Fattahi Bafghi A, Haerian Ardakani A, Zafarbaksh A. The Effect of Nonsurgical Periodontal Therapy on *Trichomonas Tenax* and *Entamoeba Gingivalis* in Patients with Chronic Periodontitis. *J Dent Shiraz Iran.* sept 2016;17(3):171-6.
45. Kofoid CA. The Protozoa of the Human Mouth. Presidential Address, American Society of Parasitologists, New York, December 29, 1928. *J Parasitol.* 1929;15(3):151-74.
46. Cembranelli SBS, Souto FO, Ferreira-Paim K, Richinho TT, Nunes PL, Nascentes GAN, et al. First evidence of genetic intraspecific variability and occurrence of *Entamoeba gingivalis* in HIV(+)/AIDS. *PloS One.* 2013;8(12):e82864.

47. Trim RD, Skinner MA, Farone MB, Dubois JD, Newsome AL. Use of PCR to detect *Entamoeba gingivalis* in diseased gingival pockets and demonstrate its absence in healthy gingival sites. *Parasitol Res.* sept 2011;109(3):857-64.
48. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* avr 2000;13(2):318-31.
49. Bonner M, Amard V, Verdy M, Amiot P, Marty M, Rochet J-P, et al. Traitement antiparasitaire des maladies parodontales et péri-implantites : suivi multicentrique à 12 mois. *Actual Odonto-Stomatol.* 1 févr 2013;(261):22-8.
50. Yazar S, Çetinkaya Ü, Hamamcı B, Alkan A, Şişman Y, Esen Ç, et al. Investigation of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in Periodontitis or Gingivitis Patients in Kayseri. *Turk Parazitoloji Derg.* mars 2016;40(1):17-21.
51. Galván-Moroyoqui JM, Domínguez-Robles M del C, Franco E, Meza I. The Interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. *PLoS Negl Trop Dis.* juil 2008;2(7):e266.
52. Kucknoor AS, Mundodi V, Alderete J. Genetic identity and differential gene expression between *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas tenax*. *BMC Microbiol.* 18 mars 2009;9:58.
53. Honigberg BM, Lee JJ. Structure and division of *Trichomonas tenax* (O.F. Muller). *Am J Hyg.* mai 1959;69(3):177-201.
54. Bóznér P, Demes P. Cell-associated and extracellular proteolytic activity of an oral flagellate, *Trichomonas tenax*. *Arch Oral Biol.* 1991;36(1):77-83.
55. Yamamoto A, Asaga E, Nagao E, Igarashi T, Goto N. Characterization of the cathepsin B-like proteinases of *Trichomonas tenax* ATCC 30207. *Oral Microbiol Immunol.* déc 2000;15(6):360-4.
56. Nagao E, Yamamoto A, Igarashi T, Goto N, Sasa R. Two distinct hemolysins in *Trichomonas tenax* ATCC 30207. *Oral Microbiol Immunol.* déc 2000;15(6):355-9.
57. Mielczarek E, Blaszkowska J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection.* août 2016;44(4):447-58.
58. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000.* juin 2010;53:55-69.
59. Bonner M, Amard V, Bar-Pinatel C, Charpentier F, Chatard J-M, Desmuyck Y, et al. Detection of the amoeba *Entamoeba gingivalis* in periodontal pockets. *Parasite Paris Fr.* 2014;21:30.
60. Kikuta N, Yamamoto A, Goto N. Detection and identification of *Entamoeba gingivalis* by specific amplification of rRNA gene. *Can J Microbiol.* déc 1996;42(12):1248-51.
61. Athari A, Soghandi L, Haghighi A, Kazemi B. Prevalence of Oral Trichomoniasis in Patients with Periodontitis and Gingivitis Using PCR and Direct Smear. *Iran J Public Health.* 2007;36(3):33-7.
62. Kikuta N, Yamamoto A, Fukura K, Goto N. Specific and sensitive detection of *Trichomonas tenax* by the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol.* mars 1997;24(3):193-7.

63. Mehr AK, Zarandi A, Anush K. Prevalence of Oral *Trichomonas tenax* in Periodontal Lesions of Down Syndrome in Tabriz, Iran. *J Clin Diagn Res JCDR*. juill 2015;9(7):ZC88-ZC90.
64. Fichorova RN. Impact of *T. Vaginalis* Infection on Innate Immune Responses and Reproductive Outcome. *J Reprod Immunol*. déc 2009;83(1-2):185-9.

NOM : JORDANA EMILIE

2018 TOU3 3023

TITRE : ETUDE CLINIQUE DE LA PREVALENCE D'ENTAMOEBA GINGIVALIS, DE TRICHOMONAS TENAX ET DE LA FLORE ASSOCIEE DANS LES PARODONTITES

---

## RESUME EN FRANÇAIS :

Les bactéries parodonto-pathogènes sont nécessaires à la survenue d'une parodontite. Depuis plus d'un siècle, des parasites ont également été observés mais leur implication dans les maladies parodontales est restée floue. 21 patients atteints de parodontite ont été inclus dans cette étude. Après le recueil des données du patient et sondage des poches parodontales, des échantillons ont été prélevés au sein de deux poches différentes. Nous avons mis en culture les bactéries et avons réalisé des PCR afin d'identifier *Entamoeba Gingivalis* et *Trichomonas Tenax*. Une prévalence de 14,28 % pour *Entamoeba Gingivalis* et de 23,8 % pour *Trichomonas Tenax* a été obtenue. Les résultats montrent qu'il est possible que ces parasites soient impliqués dans l'étiopathogénie parodontale, bien que non indispensables. D'autres études devraient approfondir ce potentiel rôle, afin d'améliorer la compréhension de la maladie.

---

TITLE: CLINICAL STUDY OF THE PREVALENCE OF ENTAMOEBA GINGIVALIS, TRICHOMONAS TENAX AND THE ASSOCIATED FLORA IN PERIODONTITIS

---

## ENGLISH ABSTRACT:

Periodontal-pathogens bacteria are necessary for the occurrence of periodontitis. For more than a century, parasites have also been observed but their involvement in periodontal disease is still unclear. 21 patients with periodontitis were involved in this study. After collecting data from patients and probing periodontal pockets, samples have been picked from two different periodontal pockets. We cultured bacteria and did PCR to identify *Entamoeba Gingivalis* and *Trichomonas Tenax*. A prevalence of 14,28 % for *Entamoeba Gingivalis* and 23,8 % for *Trichomonas Tenax* showed up. The results highlight that those parasites could be involved in the periodontal etiopathogenesis even if not mandatory. Further studies should deepen this potential role, and improve disease understanding.

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Chirurgie dentaire

---

MOTS-CLES : ENTAMOEBA GINGIVALIS, TRICHOMONAS TENAX, PARODONTITE, PARASITE, PCR

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier

Faculté de chirurgie dentaire 3 chemin des Maraîchers 31062 Toulouse Cedex

---

Directeur de thèse : Dr Pierre Pascal POULET