

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE **MASTER** EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : Biologie

Option : Génétique- physiologie

Thème

Etat des lieux et étude moléculaire des protozoaires buccaux

Entamoeba gingivalis et Trichomonas tenax

Présenté par :

❖ Mlle GROUCI Oum Salama

Date de soutenance :

21/10/2015

Devant le jury :

Pr. ADJMI H.	Professeur à l'université d'Alger	Promotrice
Mme CHARALLAH A.	Maitre-assistant à l'université de Blida 1	Co- promotrice
Mme AISSANI R.	Maitre-assistant à l'université de Blida 1	Présidente
Mme MEKLAT A.	Maitre de conférences à l'université de Blida 1	Examinatrice
Dr ABD EL OUAHED K	Maitre-assistant à l'université d'Alger	Invité donneur

Liste des abréviations

BET : Bromure d'ethidium

ED : Examen direct

HCA : Hôpital Central de l'Armée

MGG : May Grunwald Giemsa

Pb : paires de bases

PBS : Phosphate Buffer Solution

PK : protéinase K

SIDA : Syndrome d'Immuno -Déficience Acquise

TAE : Tris Acétate EDTA

TE 1x : Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8,5

Tm : melting temperature (température de fusion)

Tr : tour

VIH : virus d'immunodéficience humaine

Liste des figures

Figure 1 : Structure parodontale	3
Figure 2 : Biofilm supra et sous-gingival.....	4
Figure 1 : Etapes d'évolution de la maladie parodontale.....	5
Figure 2 : Morphologie d' <i>Entamoeba gingivalis</i>	13
Figure 5 : Morphologie de <i>Trichomonas tenax</i>	13
Figure 6 : Cycle de vie et Transmission d' <i>Entamoeba gingivalis</i>	14
Figure 7 : Résultats d'Auxacolor™.....	29
Figure 8 : Résultat PCR Ego1/Ego2.	30
Figure 9 : Résultats PCR gradient Ego 1 / Ego 2.....	30
Figure 10 : Résultats PCR PT3/PT7 dans une température de 58°C.	31
Figure 11 : Résultats PCR EGO1/EGO2	32
Figure 12 : Résultats de la PCR EGO1/EGO2.....	33
Figure 13 : Résultat PCR PT3/PT7 dans une température de 58°C.	34
Figure 14 : Résultats de la PCR PT3/PT7.	35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification d' <i>Entamoeba gingivalis</i>	15
Tableau 2 : Classification de <i>Trichomonas tenax</i>	15
Tableau 3 : groupes d'étude	16
Tableau 4 : Caractéristiques des amorces (EGO-1/ EGO-2) et (PT3/ PT7).....	23
Tableau 5 : Constituants du MIX pour la PCR Ego 1 / Ego 2.....	24
Tableau 6 : gradient température PCR (Ego 1 / Ego 2).....	24
Tableau 7 : Caractéristiques des amorces (PT3/ PT7).....	25
Tableau 8 : Constituants du MIX pour la PCR PT3 / PT7 dans un volume final de 50µl.....	25
Tableau 9 : Examen direct selon la clinique.....	27
Tableau 10 : Recherche des levures par culture Rice cream.	28
Tableau 11 : Identification des levures par Auxacolor™2	28
Tableau 12 : Caractérisation moléculaire par PCR EGO1/EGO2 selon le protocole décrit par Cembranelli et al., 2013.....	32
Tableau 13 : Résultats mycologiques correspondant aux résultats positifs par la PCR pour <i>Entamoebagingivalis</i>	34
Tableau 14 : Caractérisation moléculaire par PCR PT3/PT7 selon le protocole décrit par Kikuta et al., 1996.....	35
Tableau 15 : Résultats mycologiques correspondant aux patients présentant des <i>Trichomona tenax</i>	36

Liste des Annexes

Annexe 1 : Matériel non biologique.

Annexe 2 : Caractéristique de Tampon TE

Annexe 3 : Caractéristique de Bromure d'éthidium

Annexe 4 : caractéristique de Bleu de bromophénol à pH 8

Annexe 5 : Caractéristique de la Protéinase K

Annexe 6 : Constituants et conditions d'amplification des amorces EGO1/EGO2 selon le protocole décrit par Cembranelli et al. 2013 et PT3/PT7 Kikuta et al 1996.

Annexe7 : Liste des patients prélevés.

Annexe 8 : Liste des sucres testés par Auxacolor™2

Résumé

Les recherches portant sur les espèces de protozoaires de la bouche sont limitées et menées uniquement dans quelques pays. Elles concernent surtout la pathogénicité d'*Entamoeba gingivalis* et de *Trichomonas tenax* qui occupent une position controversée pour beaucoup d'auteurs.

Le but de notre travail a été de mettre au point et d'appliquer une technique d'amplification génique (PCR) pour le diagnostic d'*Entamoeba gingivalis* et de *Trichomonas tenax* en utilisant deux types d'amorces ; la première cible la sous unité ribosomale 18S-SSU ARNr de l'*Entamoeba gingivalis* (EGO1/EGO2) et la seconde cible le gène de la sous unité ribosomale ARNr18S de *Trichomonas tenax* (PT3 /PT7). Cette étude a été menée parallèlement à une étude phénotypique habituellement utilisée au laboratoire par examen direct et culture pour la recherche des champignons microscopique.

Ce travail a montré une forte sensibilité de la PCR par rapport à l'examen direct et à la culture. La PCR montre une positivité de 12% (9/76) pour *Entamoeba gingivalis* et une positivité de 5% (4/76) pour *Trichomonas tenax*. Ces résultats ont montré que les sujets VIH/Sida sont plus touchés par les parasites précédemment détectés par la PCR.

Mots clés: *Entamoeba gingivalis*, *Trichomonas tenax*, Parodontite, Gingivite, VIH

Abstract

Research on the species of protozoa of the mouth are limited and carried only in a few countries. It concerns especially the pathogenicity of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax*, which occupies a controversial position for many authors.

The aim of our work is to develop and implement a gene amplification technique (PCR) for the diagnosis of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* using two types of primers; the first target the ribosomal subunit 18S, SSU rRNA *Entamoeba gingivalis* (EGO1 / EGO2) and the second target gene under the ARNr18S ribosomal unit *Trichomonas tenax* (PT3 / PT7). It is conducted in parallel with a phenotypic study normally used in the laboratory by direct examination and culture for research of microscopic fungi.

This work has shown high sensitivity of PCR compared to direct examination and culture. Shows a PCR positivity of 12% (9/76) for *Entamoeba gingivalis* and positivity of 5% (4/76) for *Trichomonas tenax*. These results revealed that subjects HIV / AIDS are more affected by the previously detected parasites by PCR

Keywords: *Entamoeba gingivalis*, *Trichomonas tenax*, periodontitis, gingivitis, HIV.

ملخص

الدراسات التي تمت عن الطفيليات الفموية قليلة و محصورة في بعض البلدان فقط و هي تتعلق خاصة بحالة المرض ب *Entamoeba gingivalis* و *trichomonas tenax* و التي تحتل مكانة مثيرة للجدل لكثير من المؤلفين.

الهدف من عملنا هو تنفيذ تقنية تضخيم الجينات (PCR) من اجل تشخيص *Entamoeba gingivalis* و *Trichomonas tenax* باستخدام نوعين من البادئات (Amorces)، الأولى (EGO1/EGO2) تستهدف تحت الوحدة الريبوزومية ل *Entamoeba gingivalis* 18S-SSU ARNr، أما الثانية (PT3/PT7) فهي تستهدف مورثة لتحت الوحدة الريبوزومية. ARNr18S إضافة إلى ذلك جرت الدراسة بالتوازي مع دراسة مظهرية التي تستخدم عادة في المخبر عن طريق الفحص المباشر وكذلك الزرع (الزيادة في النمو) للبحث عن الفطريات المجهرية.

أظهر هذا البحث حساسية عالية ل PCR مقارنة بالفحص المباشر والزرع. حيث كانت النتائج إيجابية تقدر ب 12% (76/9) بالنسبة ل *Entamoeba gingivalis*، و 5% (76/4) بالنسبة ل *Trichomonas tenax*، واتضح من هذه النتائج أن الأشخاص المصابين بفيروس نقص المناعة المكتسبة (الإيدز) هي الفئة الأكثر تضررا بالطفيليات المحددة سابقا عن طريق ال PCR.

الكلمات المفتاحية: *Entamoeba gingivalis*، *Trichomonas tenax*، parodontite، اللثوية، مرض نقص المناعة المكتسبة.

Tables des matières

Introduction	1
Chapitre I: Généralité sur les protozoaires buccaux	
I. L'écosystème buccal.....	2
I.1. L'organe dentaire.....	2
I.2. Biofilm.....	3
II. Les maladies parodontales	4
II.1. Définition.....	4
II.2. Classification.....	4
III. Flore bucco-dentaire : commensaux et pathogènes	5
III.1. Les niches écologiques	6
III.2. Les espèces particulières de la microflore buccale	6
III.3. Microorganismes non bactériens à potentiel parodontopathogène.....	6
III.3.1. Parasites.....	7
III.3.2. Levure de genre <i>Candida</i>	7
IV. Les Protozoaires	8
IV.1. Protozoaires buccaux	8
IV.1.1. <i>Entamoeba gingivalis</i>	8
IV.1.2. <i>Trichomonas tenax</i>	9
IV.2. Pathogénicité de l' <i>Entamoeba gingivalis</i> et de <i>Trichomonas tenax</i>	10
IV.2.1. Pathogénicité d' <i>Entamoeba gingivalis</i>	10
IV.2.2. Pathogénicité de <i>Trichomonas tenax</i>	11

IV.3.Caractéristiques morphologiques.....	11
IV.3.1. Morphologie des parasites buccaux	11
IV.3.1.1. <i>Entamoeba gingivalis</i>	12
IV.3.1.2. <i>Trichomonas tenax</i>	13
IV.4. Support et mécanisme de transmission.....	13
IV.4.1. Habitat et mécanisme de transmission d' <i>Entamoeba gingivalis</i>	13
IV.4.2. Habitat et mécanisme de la transmission de <i>Trichomonas tenax</i>	14
IV.5.Classification des protozoaires buccaux	15

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel	16
I.1. Matériel biologique	16
I.2. Matériel non biologique.....	16
II. Méthodes.....	16
II.1. Prélèvements	17
II.2. Examen direct.....	17
II.3. Culture	17
II.4. Etude moléculaire.....	18
II.4.1. Extraction d'ADN.....	18
II.4.2. L'amplification de l'ADN.....	19
II.4.3. La révélation des produits PCR	21
II.4.4. Lecture et interprétation des résultats	23
II.5. Mise au point de la PCR pour <i>Entamoeba gingivalis</i>	23
II.6. Mise au point de la PCR PT3 /PT7 pour <i>Trichomonas tenax</i>	24

Chapitre III : Résultats et interprétation

I. Résultats des examens directs en protozoologie.....	27
II. Résultats mycologiques.....	27
III. Mise au point des PCRs pour l'identification moléculaire d' <i>Entamoeba gingivalis</i> et <i>Trichomonas tenax</i>	29
IV. Diagnostic moléculaire (PCR).....	31
Discussion.....	37
Conclusion.....	44
Annexe	
Références bibliographiques	

Le parodonte est l'ensemble des tissus de soutien de la dent, constitué principalement de la gencive et de l'os alvéolaire.

Les maladies parodontales représentent l'ensemble des affections atteignant le parodonte, et sont causées par une mauvaise hygiène bucco-dentaire entraînant au bout de quelques jours une gingivite, la plaque dentaire est le seul facteur incriminé. Le tartre est le principal facteur favorisant ces pathologies.

La cavité buccale comporte, dans des conditions normales, de très nombreux micro-organismes saprophytes, bactéries, levures (*Candida*) et Protozoaires (*Entamoeba gingivalis*, *Trichomonas tenax*) dont certains sont d'ailleurs utiles. Les Protozoaires buccaux doivent être considérés comme des pathogènes potentiels avec une capacité de dérégulation du processus immunitaire dans les parodontites.

L'*Entamoeba gingivalis* est une amibe considérée comme un organisme commensal inoffensif chez l'homme et généralement retrouvé dans le tartre, les plaques bactériennes, le fluide gingival et la salive.

Le *Trichomonas tenax* est un protozoaire de répartition mondiale, C'est un micro-organisme invité normal dans la cavité buccale humaine et considéré comme un commensal, il est retrouvé au niveau des collets des dents, des poches parodontales, des cavités carieuses, du fluide gingival, de la salive et des cryptes amygdaliennes.

La problématique de notre thème est l'identification de ces deux protozoaires (*Entamoeba.gingivalis* et *Trichomonas.tenax*) par la technique de PCR et la détermination de leurs fréquences chez des patients atteints du VIH/SIDA traités ou contrôlés au niveau du service des maladies infectieuses et chez des patients pris en charge au niveau du service de stomatologie.

L'objectif de ce travail consiste d'abord, en la mise au point de deux PCRs afin d'identifier les deux protozoaires buccaux (*Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax*). Par la suite, nous tenterons d'appliquer ces PCRs dans de rechercher la présence ou non des gènes codant pour ces deux protozoaires chez un groupe de patients recrutés au niveau de l'Hôpital Central de l'Armée (Alger).

I. l'écosystème buccal

La cavité buccale est le premier segment du tube digestif humain, une des parties les plus hétérogènes formées par des tissus et des structures corporelles complexes et irrégulières, comme le parodonte, sillon gingival, les muqueuses, des joues et de la langue.

La cavité buccale est un espace ouvert sur l'extérieur, humide, de température stable (34-36°C) et d'un pH avoisinant la neutralité. Elle est composée avec les micro-organismes buccaux l'écosystème buccal (Chardin et al., 2006).

La bouche représente un excellent environnement pour l'insertion et la survie de bactéries, parasites, mycoplasmes, levures et virus, dont l'abondance et la virulence varient selon les individus, les conditions locales et l'état général des sujets. IL s'agit en réalité d'un écosystème offrant de nombreuses niches écologiques à la flore qui le peuple.

I.1.L'organe dentaire

L'organe dentaire est formé par l'odonte et de ses tissus de soutien, le parodonte (fig 1).

I.1.1.Le parodonte

C'est la structure anatomique et fonctionnelle qui maintient les dents en place sur les mâchoires. Le parodonte est divisé en deux parties (Kuffer, 2009 ; Ouhayoun, 2012).

I.1.1.1.Le parodonte superficiel « la gencive »

Définie comme étant la partie spécialisée de la muqueuse buccale, qui sertit le collet anatomique des dents et recouvre une partie des procès alvéolaires. La gencive saine apparait à l'examen clinique rose pâle, ferme, piquetée en peau d'orange et fermement attachée aux structures sous-jacentes.

I.1.1.2. Le parodonte profond

Représenté par le desmodonte, le ciment et l'os alvéolaire.

I.1.2.Odonte

L'odonte est constitué de trois éléments : l'émail, la dentine et la pulpe.

I.1.3.Parodonte sain

La santé parodontale peut être définie comme un état stable dans le temps de chacun des quatre tissus parodontaux suivants : gencive, os alvéolaire, ciment, ligament parodontal. On trouve dans les sites sains ou assainis des germes provenant du milieu buccal et de la plaque dentaire. La composition de la flore microbienne associée à la santé parodontale varie cependant en fonction de l'âge et des antécédents de maladie parodontale.

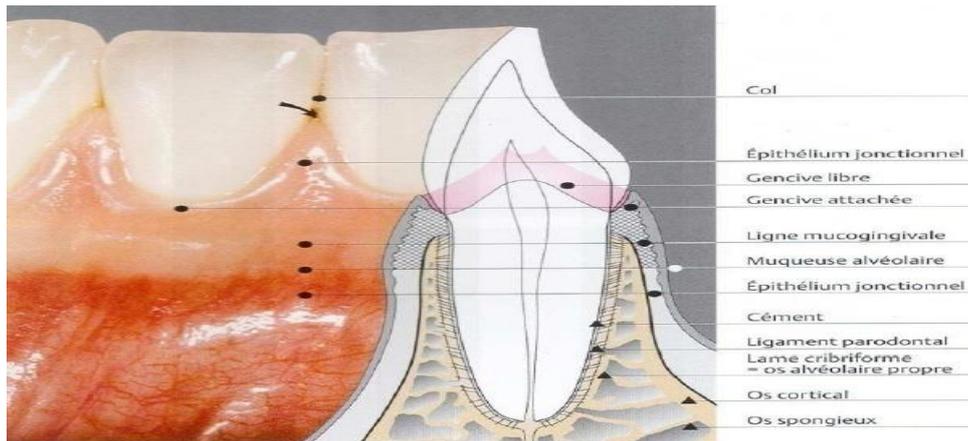


Figure 1 : Structure parodontale (Herbert et al., 2004).

I.2. Biofilm

La quasi totalité des bactéries à la surface de la planète sont adhérentes à une surface et font partie d'une structure complexe et organisée, appelée biofilm, constituée de différents agrégats bactériens inclus dans une matrice extracellulaire protectrice et comportant des canaux hydriques, par lesquels circulent les nutriments, l'oxygène et les produits de dégradation du métabolisme bactérien, et un système de communication permettant des échanges d'information entre les microcolonies bactériennes. (Ouhayoun, 2012)

I.2.1. Définition du biofilm dentaire

Le biofilm dentaire est le principal habitat bactérien de la cavité buccale, et niche écologique principale de la plupart des micro-organismes de la flore buccale.

I.2.3. Classification du biofilm

Il existe deux types de biofilms dentaires, selon leur localisation (fig 2).

I.2.3.1. Biofilm supra-gingival

Le biofilm supra-gingival n'est cliniquement détectable que lorsqu'il atteint une certaine épaisseur, il apparaît alors comme un enduit blanc jaunâtre localisé tout d'abord le long du rebord gingival. Son identification se réalise soit à l'aide d'une sonde déplacée sur la surface dentaire soit par coloration.

Le biofilm supra-gingival donne des pathologies carieuses à la surface des dents, salive, face dorsale de la langue, les muqueuses jugales.

I.2.3.2. Biofilm sous-gingival

Il constitue la continuité apicale du biofilm supra gingival, il est à l'origine des maladies parodontales.

Le biofilm sous-gingival donne des pathologies parodontales : le sillon gingival, le fluide gingival.

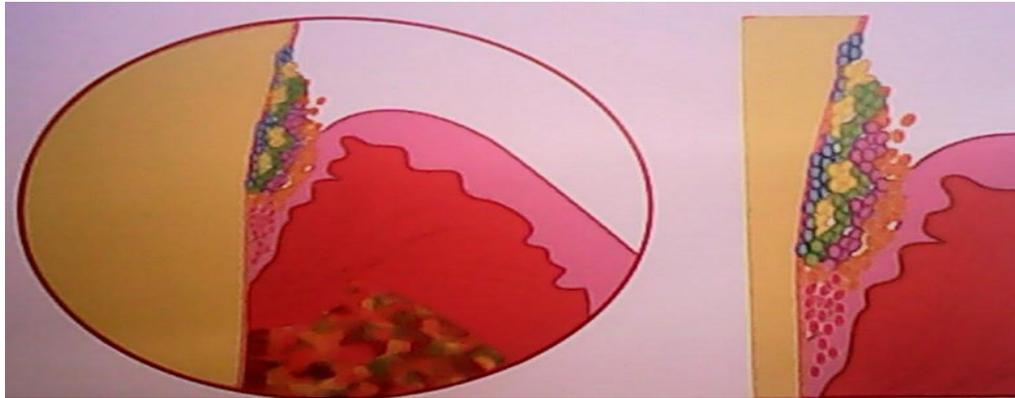


Figure 2 : Biofilm supra et sous-gingival (Ouhayoun, 2012).

II. Les maladies parodontales

II.1. Définition

Les maladies parodontales, ou parodontopathies, sont des maladies inflammatoires d'origine infectieuse, multifactorielles très répandues qui entraînent la destruction des tissus de support de la dent. Les formes les plus sévères des parodontopathies « les parodontites » sont la principale cause de perte des dents chez l'adulte (fig 3).

II.2. Classification

Les maladies parodontales sont divisées en deux grands groupes. Le premier groupe inclut les maladies limitées aux tissus parodontaux superficiels (les gingivites). Le deuxième groupe inclut les maladies touchant le parodonte profond qui soutient la dent (parodontites).

II.2.1. Les gingivites

Les gingivites provoquées par la plaque bactérienne représentent l'atteinte gingivale la plus fréquente. Elle peut survenir à tout âge (enfants et adultes) avec une prévalence pouvant atteindre 50 à 100% dans la population adulte. En dehors des périodes de grossesse, la femme est moins atteinte que l'homme et les lésions sont moins importantes que celles observées chez l'homme. Le rôle étiologique de la plaque bactérienne est reconnu puisque chez des patients présentant un parodonte sain, l'arrêt du contrôle de plaque entraîne tout d'abord l'apparition d'une inflammation discrète au niveau de la gencive marginale, puis de plus en plus marquée

dans le temps. Cette atteinte gingivale est réversible, le contrôle de la plaque permet un retour à la normale. Elle n'atteint que le parodonte superficiel. La cause des gingivites peut être due à des éléments autres que la plaque bactérienne comme par exemple, des changements hormonaux et la prise de médicaments. L'aggravation de la gingivite conduit à la parodontite.

II.2.2. La parodontite

La parodontite est une maladie inflammatoire et infectieuse d'origine polymicrobienne. Cette maladie est induite par des bactéries anaérobies à Gram négatif. Cliniquement et radiologiquement, elle se distingue de la gingivite car elle affecte les tissus de soutien de la dent, ce qui se traduit par une destruction progressive du ligament parodontal et une migration apicale de l'attache épithéliale le long de la surface radiculaire associée à une destruction de l'os alvéolaire de support. Cliniquement, les changements se traduisent par la formation d'une poche parodontale, c'est-à-dire la migration apicale de l'épithélium de jonction, accompagné ou non de récessions gingivales.



Figure 3 : Etapes d'évolution de la maladie parodontale. Fiches conseils du centre dentaire du vert galant (<http://www.centredentaireduvertgalant.com/200-fichespratiques/les-gencives/maladies-parodontales.php>).

III. Flore bucco-dentaire : commensaux et pathogènes

La flore buccale constitue un écosystème complexe riche en bactéries, champignons et composé de plus de 500 espèces soit environ 20 genres bactériens, cette flore varie dans le temps mais aussi d'un site de prélèvement à un autre. Dès la naissance la flore buccale inexistante in utero va se constituer à partir de l'environnement et principalement au contact de la mère lors du maternage, des bactéries sont présentes transitoirement, certaines

colonisent de façon durable la bouche et la langue de l'enfant en adhérant à des surfaces grâce à des récepteurs spécifiques. A ce stade, l'immaturité immunologique autorise cette première colonisation.

Par la suite, la première denture augmentera significativement le nombre potentiel de niches et de sites de fixation des bactéries, de même que le sillon gingival permettra d'autres colonisations en atmosphère anaérobie.

Les déterminants écologiques sont soit physico-chimiques (température, oxygène, pH..) soit anatomo-histologiques (muqueuse, salive) soit nutritionnels : milieu buccal.

La flore buccale se modifie tout au long de la vie selon les événements physiologiques tel que ; l'adolescence, la grossesse, la ménopause, l'andropause, le vieillissement, ou pathologiques (perte des dents, maladies générales...).

III.1. Les niches écologiques

Les plus évidentes sont les cryptes amygdaliennes, et toutes les zones non exposées au contact du bol alimentaire, à l'auto-nettoyage postprandial, ou protégées de la salive, sont susceptibles d'abriter des micro-organismes; il faut signaler en particulier les capuchons des dernières molaires, le sillon gingivo-dentaire (et son développement pathologique, la poche parodontale), les puits des faces occlusales, les fissures de l'émail, les points de contact interdentaires, les caries, les reconstitutions iatrogènes (amalgames, composites ou coiffes débordantes) et les chevauchements dentaires. Les zones exposées, dotées de villosités, comme le dos de la langue, ou apparemment lisses, comme les gencives, constituent des supports appréciés des micro-organismes, en raison des récepteurs d'adhérence que comportent leurs cellules superficielles.

III.2. Les espèces particulières de la microflore buccale

La cavité buccale humaine renferme une flore abondante et polymorphe des germes, la majorité de ces micro-organismes sont des bactéries. La santé gingivale est associée à des espèces bactériennes à Gram positif, appartenant aux genres *Streptococcus* et *Actinomyces* (Slots, 1977). Cette cavité renferme également des mycoplasmes, des virus, des levures et deux parasites en particulier dont un flagellé : *Trichomonas Tenax* et l'autre, un rhizopode (amibe) : *Entamoeba Gingivalis* (Rouviere, 1974).

III.3. Microorganismes non bactériens à potentiel parodontopathogène

Le facteur étiologique principal des maladies parodontales est bactérien. Mais il existe quelques microorganismes dont le potentiel parodontopathogène a été évoqué.

III.3.1. Parasites

Les protozoaires *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax* font partie de la flore normale de nombreux individus. Leur nombre augmente dans les pathologies bucco-dentaires, et notamment dans les parodontopathies. *Entamoeba gingivalis* est aussi très présente chez les personnes âgées. Pendant longtemps, on a pensé qu'*Entamoeba gingivalis* avait un rôle important dans le déclenchement des parodontites. Cette affirmation se fondait sur le fait que l'augmentation du nombre d'amibes était associée à une gingivite ou des lésions parodontales (Barrett, 1914). L'hypothèse amibienne a été invalidée quand il a été démontré que des bouches saines pouvaient contenir des amibes alors que des sites atteints en étaient indemnes (Socransky et Haffajee, 1994).

III.3.2. Levure de genre *Candida*

Les *Candida* sont des levures, microorganismes unicellulaires, saprophytes de la cavité buccale. Parmi les espèces connues, seules certaines sont pathogènes pour l'homme. *Candida albicans* est la plus fréquente. Ces levures peuvent devenir des agents opportunistes en cas d'immunodépression ou de déséquilibre de l'écosystème du biofilm, ce qui peut se produire après une intervention chirurgicale, en présence d'ulcération muqueuse, ou après une antibiothérapie. Au cours d'une infection à VIH, la candidose buccale est un signe fréquent et précoce. Sa présence correspond à un taux de lymphocytes CD4 inférieur à 400/mm³. Le port de prothèses amovibles est le principal facteur prédisposant le plus fréquent à la candidose, du fait des altérations muqueuse qu'elles peuvent provoquer (Butz-Jørgensen et Lombardi, 1996). Une augmentation du nombre de *Candida* dans les poches parodontales profondes peut être observée après antibiothérapie (Helovuo et al., 1993). Cependant le rôle étiologique de *Candida* dans les parodontites semble peu probable (Dalhén et Wikström, 1995). Il est toutefois possible de trouver un *Candida* dans les poches parodontales, et dans ce cas sa présence est fréquemment associée à celle d'*Eubacterium saburreum* (Reynaud et al., 2001).

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés à deux protozoaires (*Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax*) et à des levures de genre *Candida*.

IV. Les Protozoaires

L'Entamoeba gingivalis et le *Trichomonas tenax* ont été isolés dans la bouche, ils sont présents dans les bouches saines, mais se développent bien dans les bouches mal entretenues. Ils ont été retrouvés chez plus de 75% des sujets âgés de plus de 40 ans, Ce sont des Protozoaires, c'est-à-dire des organismes eucaryotes, motiles et unicellulaires, rencontrés seulement sous forme végétative ou trophozoïte et aucune forme de résistance.

Leur mode de contamination le plus habituel est le comptage direct et leur développement s'effectue en anaérobiose plus ou moins stricte. Ils se nourrissent en phagocytant les microorganismes de la plaque, les débris alimentaires et les cellules de défenses (polymorphonucléaires), et se déplacent grâce à des pseudopodes (*Entamoeba Gingivalis*) ou à des flagelles (*Trichomonas Tenax*).

Dans notre étude, il s'agit de faire le point sur ces deux protozoaires relativement méconnus, tant au niveau de leur présence que leur possible implication dans la pathogénie des maladies parodontales.

IV.1. Protozoaires buccaux

Les Protozoaires buccaux doivent être considérés comme des organismes pathogènes avec la capacité de disrégulation du processus immunitaire dans les parodontites et péri-implantites.

Entamoeba gingivalis et *Trichomonas tenax* sont des protozoaires saprophytes, retrouvés dans la cavité buccale. Ils semblent être associés à une mauvaise hygiène buccale et à la parodontite (Bergquist R, 2009).

IV.1.1. *Entamoeba gingivalis*

Les amibes sont des organismes unicellulaires appartenant au règne des protistes et sont considérées comme peu importants pour la santé humaine (Perez et al, 1997).

L'Entamoeba gingivalis a un grand intérêt historique, car ce fut la première amibe symbiotique décrite chez l'homme (Cuevas et al, 2006), et sa première description s'est faite en Russie, par Gross en 1849.

Entamoeba gingivalis est une amibe considérée comme un organisme commensal inoffensif chez l'homme et généralement retrouvé dans le calcul et plaques bactériennes, fluide gingival et la salive (Jaskoski ,1963 ; Wantland et Lauer, 1970 ; Favoreto et Machado, 1995 ; Gharavi et al., 2006).

Entamoeba gingivalis est l'une des sept espèces d'*Entamoeba* infectant communément l'Homme, elle est fréquemment retrouvée au niveau de l'oropharynx où elle est considérée comme commensale. Cette amibe vit dans la région péri dentaire au niveau du tartre, sur la gencive et spécialement dans les cavités des dents cariées. Elle fut aussi isolée au niveau des cryptes amygdaliennes, de leurs sections tissulaires ainsi qu'au niveau de frottis d'expectorations (Gharavi et al., 2006 ; Bhaijee et Bell, 2011)

IV.1.2.Trichomonas tenax

Trichomonas tenax, ou *trichomonas* de la bouche, est un protiste vivant dans la cavité buccale de l'homme, du chien et du chat (Kofoid, 1929). *Trichomonas tenax* est un protozoaire de répartition mondiale, dont les hôtes sont « l'homme » et certains singes. C'est un micro-organisme invité normale de la cavité buccale humaine, et considéré comme un commensal, il est retrouvé au niveau des collets des dents, des poches parodontales, des cavités carieuses, du fluide gingival, de la salive, des cryptes amygdaliennes. Il se nourrit aux dépends d'autres micro-organismes : il s'agit donc d'un parasitisme.

La prévalence du portage est en moyenne de 22 dans la population européenne, ce portage est favorisé par le manque d'hygiène buccale, le mauvais état parodontal et les caries. Le tartre et le tabac sont également des facteurs favorisants, probablement par irritation du parodonte. *Trichomona tenax* serait impliqué dans la dégradation des tissus parodontaux, par sécrétion de diverses substances (phosphatase acide, fibronectine, cathepcine).

L'hygiène habituelle n'est en général pas suffisante pour éliminer ce parasite. C'est un parasite parfois dit sans importance bien qu'il soit fréquemment rencontré lors des infections parodontales (Bonner, 2009).

Sa présence dans les gingivites ulcéro-nécrosantes (GUN) et parodontites ulcéro-nécrosantes (PUN) en font un pathogène aggravant de la maladie parodontale. Ce parasite est aussi présent

dans certaines maladies chroniques pulmonaires ou son élimination a permis la guérison (Mussaev 1976). Il en va de même pour l'incidence et la guérison apparente de la maladie parodontale suivant son élimination conjointement avec l'amibe *Entamoeba gingivalis* (Lyons *et al.*, 1980 ; Lyons, 1989). L'âge serait aussi un facteur d'importance (Kofoid *et al.*, 1929) et l'intense inflammation serait caractéristique.

IV.2. Pathogénicité d'*Entamoeba gingivalis* et de *Trichomonas tenax*

Pour de nombreux auteurs *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax* demeurent des commensaux inoffensifs de la cavité buccale vivants en saprophytes, pour d'autres autres, ils sont en rapport direct avec l'installation ou l'aggravation de la maladie parodontale.

Ces dernières années, les progrès en bactériologie et en immunologie ont permis d'affiner les connaissances sur les mécanismes étiopathogéniques du développement des maladies parodontales.

Les recherches portant sur les protozoaires de la bouche sont très limitées et ont été menées dans quelques pays (Jaskoski, 1963 ; Gharavi *et al.*, 2006).

La pathogénicité d'*Entamoeba gingivalis* et de *Trichomona tenax*, occupe une position plutôt incertaine.

La fréquence la plus élevée et la quantité la plus important sont observées chez ceux qui montrent des étapes progressives de la maladie parodontale (Kofoid 1929 ; Wantland *et al.*, 1963).

IV.2.1. Pathogénicité d'*Entamoeba gingivalis*

La pathogénicité d'*Entamoeba gingivalis* est contradictoire, parce qu'il a été détecté chez les individus sains, mais a également associé à la maladie parodontale (Trim *et al.*, 2011). Certains auteurs le considèrent comme un micro-organisme non pathogène, colonisant le tissu gingival (Clayton *et Ball*, 1954 ; Al-Saeed, 2003). Toutefois, et selon plusieurs études épidémiologiques, il est clair que ce parasite est plus lié à des patients atteints de maladie parodontale, maladie de la gencive qu'à des individus avec une bonne santé buccodentaire (Wantland, 1958 ; Gottlieb *et Miller*, 1971 ; Chen *et al.*, 2000).

Des données expérimentales provenant de l'extérieur montrent que *Entamoeba gingivalis* peut provoquer des lésions tumorales dans un petit laps de temps (Chen *et al.*, 2000).

Les trophozoïtes d'*Entamoeba gingivalis* peuvent adhérer à la surface épithéliale et l'activité de ses pseudopodes et la libération d'enzymes provoquent la lyse des tissus parodontaux.

Le pouvoir pathogène semble être lié à la présence de vacuoles associées à différents types d'enzymes comme l'hydrolase dans les lysosomes et la libération de radicaux oxygénés lyse les cellules et peut provoquer la destruction des membranes cellulaires du tissu gingival. Le pathogène *Entamoeba gingivalis* ressemble à *Entamoeba histolytica*, les deux ont la capacité d'ingérer des globules rouges. Cependant, la présence de ces protozoaires dans une muqueuse en bonne santé, n'exclut pas leur pouvoir pathogène potentiel (Jaskoski, 1963).

IV.2.2. Pathogénicité de *Trichomonas tenax*

Trichomonas Tenax comme un agent pathogène avait été clairement impliquée dans divers processus pathologiques comme les pyorrhées alvéolo-dentaires, la congestion des gencives qui saignent facilement au brossage, les gingivites, qui se posent principalement à l'extérieur des limites de la bouche. Même si une relation entre la fréquence accrue de ce protozoaire et la progression de la maladie parodontale a été démontrée, la capacité de *Trichomonas Tenax* à causer des infections orales et le mécanisme de lésions tissulaires, ne sont pas bien connus.

IV.3. Caractéristiques morphologiques

IV.3.1. Morphologie des parasites buccaux

D'un point de vue morphologique, *Entamoeba Gingivalis* se présente comme une grosse cellule (30 à 50µm) où l'endoplasme granuleux est nettement distinct de l'ectoplasme clair formant de larges pseudopodes nets et actifs. Des vacuoles digestives contiennent de multiples corps étrangers : bactéries, débris cellulaires ou parfois encore la structure de noyaux altérés de polynucléaires et quelques hématies (fig.4). *Trichomonas Tenax* se présente sous la forme d'une cellule piriforme, d'environ 5-10µm de grand axe, très mobile. Quatre flagelles antérieurs et un flagelle récurrent sont rattachés au corps cellulaire, Il possède un noyau et un cytoplasme contenant des vacuoles digestives (d'endocytose, de pinocytose ou de phagocytose) (Feki et Molet, 1990).

IV.3.1.1. *Entamoeba gingivalis*

Des rapports basés sur des études au microscope d'échantillons cliniques et de la culture théorisée rapportent que ces amibes peuvent avoir des formes kystiques avec 2-4 noyaux immatures et huit cœurs matures (Wantland et al. 1960). Toutefois, La plupart des auteurs décrivent que l'*Entamoeba gingivalis* a seulement la forme de trophozoïte dans son cycle de vie (Al-Saeed, 2003 ; Hekmat et al., 2006).

Les trophozoïtes d'*Entamoeba gingivalis* sont caractérisés par la formation et l'émission de pseudopodes actifs par rapport aux autres espèces d'amibes (Wantland, 1960 ; Jian et al., 2008; Huang et al., 2009) et ceux-ci peuvent être explosifs, uni ou multidirectionnels et présentent une morphologie variable, parfois grandes et, ou sous formes d'étoiles, de branches, de chapeau, d'aiguilles et de bandes (Dobell, 1920; Wantland et al., 1963; Gharavi et al., 2006). Les données se référant à sa taille sont controversées et varient entre 5-35µm, en moyenne entre 24.67 et 17, 8 micromètre (Jaskoski, 1963 ; Perez et al.,1997 ; Chen et al., 1999; Al-Saeed, 2003).

L'ectoplasme et l'endoplasme de l'*Entamoeba gingivalis* sont très bien différenciés, et le cytoplasme granulaire se complète de vacuoles contenant des inclusions particulières et l'absence d'ADN hyalin, montrant l'emplacement où le pseudopodes sont formés (Dobell 1920 ; Wantland et al., 1960).

Les données de la littérature sont controversées sur la présence de mitochondries, certains auteurs mentionnent que ce protozoaire n'a pas de telles organites (Kikuta et al., 1996) et d'autres soulignent sa présence près de la base du parasite (Wantland et al., 1960; Keller et al., 1967) les mettant en valeur à travers la microscopie électronique à transmission (Junior et Machado, 1995) en tant que structures typiques, avec formes ovoïdes ou irrégulières, couvertes par une membrane extérieure dense et un membrane intérieure qui invagine pour former des nervures tubulaires qui composent la matrice (Keller et al., 1967) contenant quelques crêtes, il existe une autre caractéristique , l'absence de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Junior et Machado, 1995). Son caryosome est grand et central avec une trame grossière de la chromatine périphérique (Dobell, 1920 ; Gharavi et al., 2006 ; Jian et al., 2008).



Figure 4 : Morphologie d'*Entamoeba gingivalis* (Bonner et al., 2014).

IV.3.1.2. *Trichomonas tenax*

C'est le plus petit des trois Tripanosomas de l'homme, Il n'existe pas de forme kystique pour les *Trichomonas*. La forme végétative (trophozoïte) mobile, en amande, incolore, réfringente à l'état frais, mesure 10-15 μm de long sur 7 μm de large. Elle présente un axostyle qui traverse la cellule et dépasse en arrière du corps, un noyau ovalaire à la partie antérieure du corps et un kinétoplaste d'où partent 4 flagelles libres antérieurs et 1 flagelle récurrent formant une membrane ondulante, qui s'arrête au 2/3 de la longueur du corps. Ce sont les flagelles qui assurent la mobilité (tourne sur elle-même). Lorsque la température baisse, la forme végétative s'arrondit et la mobilité diminue (fig.5).

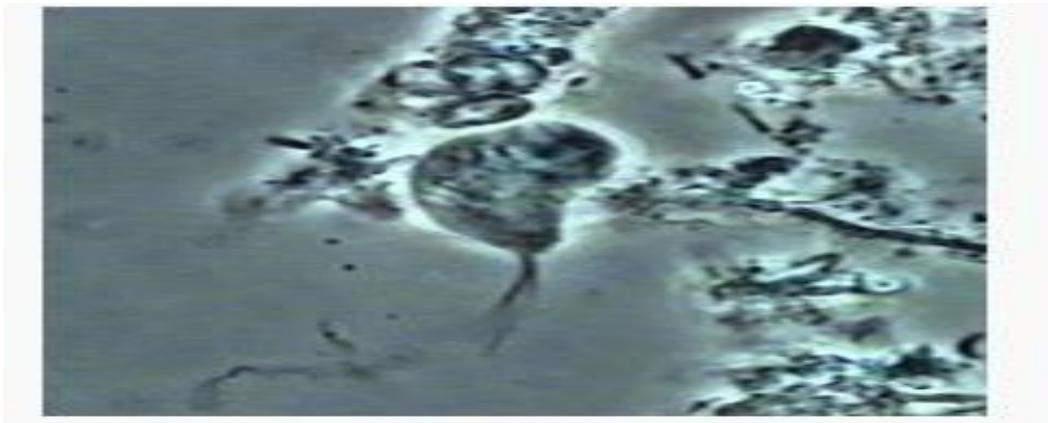


Figure 5 : Morphologie de *Trichomonas tenax* (Bonner, 2009).

IV.4. Support et mécanisme de transmission**IV.4.1. Habitat et mécanisme de transmission d'*Entamoeba gingivalis***

Normalement, ce parasite est retrouvé autour des dents, des gencives et des caries. Il a également été isolé dans les cryptes des amygdales, sinus maxillaire, au sommet de dents extraites et la pulpe dentaire des patients atteints de la maladie parodontale (Gottlieb et Miller, 1971 ; Gottlieb et al., 2006).

La transmission *Entamoeba gingivalis* se produit par la salive présente lors du partage de la nourriture contaminée, en s'embrassant sur la bouche, c'est équivalent à la transmission de bactéries qui causent la carie dentaire (Jian et al., 2008 ; Huang et al., 2009)

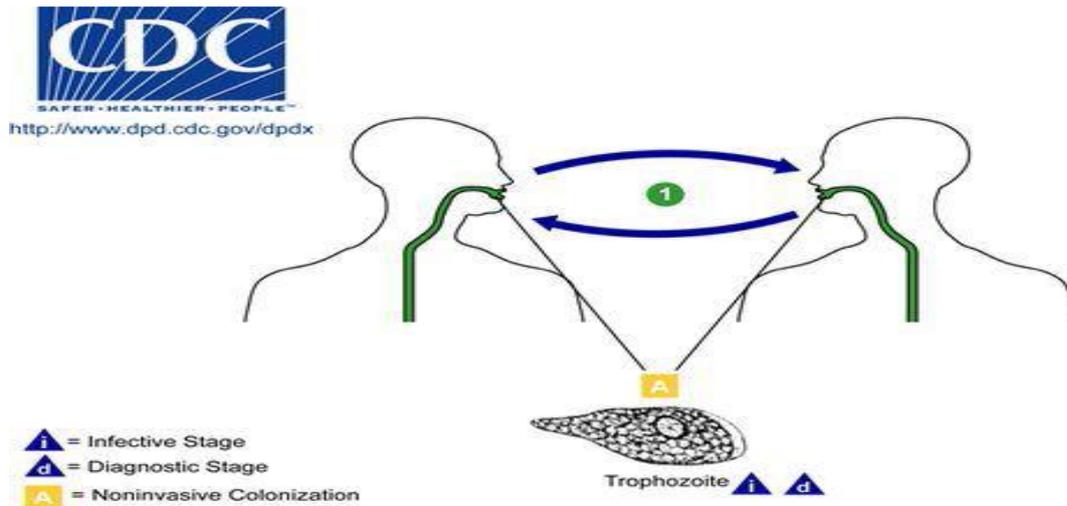


Figure 4 : Cycle de vie et Transmission d'*Entamoeba gingivalis*

Source: Centers for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov)

IV.4.2. Habitat et mécanisme de la transmission de *Trichomonas tenax*

Ce parasite de la cavité buccale, vit dans le tartre dentaire, sur les gencives, les cryptes amygdaliennes, les clapiers de pyorrhée alvéolo-dentaire, dans la salive chez les patients ayant une mauvaise hygiène dentaire. Il a aussi été découvert dans les expectorations et les prélèvements bronchiques.

La transmission de *Trichomona tenax* sous forme végétative, est soit directe par la salive (contacts buccaux), soit indirecte par l'intermédiaire des objets souillés par la salive des sujets parasités.

IV.5. Classification des protozoaires buccaux

IV.5.1. *Entamoeba gingivalis*

Entamoeba gingivalis habite la cavité buccale et appartient à la famille Endamoebidae et de genre *Entamoeba* (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification d'*Entamoeba gingivalis*

Classification	
Domaine	Eukaryota
Embranchement	Protozoa
Sous-embranchement	Sarcodina
Superclasse	Rhizopoda
Classe	Lobosa
Ordre	Amoebida
Famille	Entamoebidae
Genre	<i>Entamoeba</i>
Nom binominal : <i>Entamoeba gingivalis</i> Gros, 1849 - Brumpt (1913)	

IV.5.2. *Trichomonas tenax*

Trichomonas tenax habite la cavité buccale et appartient à la famille Trichomonadidae et de genre *Trichomonas* (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification de *Trichomonas tenax*

Classification	
Domaine	Eukaryota
Règne	Excavobionta
Embranchement	Metamonada
Superclasse	Trichozoa
Classe	Parasalia
Ordre	Trichomonaadida
Famille	Trichomonadidae
Genre	<i>Trichomonas</i>
Nom binominal : <i>Trichomonas tenax</i> (Müller,1773)	

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Central de L'Armée d'Alger, s'étendant de Mars à Août 2014. Il s'agit d'une étude prospective qui a porté sur 76 patients qui ont été traités ou contrôlés au niveau du service des maladies infectieuses et du service de stomatologie.

L'objectif de notre travail consistait dans un premier temps en la mise au point de deux PCR afin d'identifier deux protozoaires buccaux (*Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax*). Dans un deuxième temps, ces PCRs ont été employées pour tenter d'identifier les protozoaires en question chez un groupe de malades.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Patients : les groupes d'étude

Cette étude a été réalisée sur 76 échantillons, ces patients ont été divisés en 3 groupes : voir tableau 3.

Tableau 3 : groupes d'étude

	Service	clinique	N patients	Hommes	Femmes	Age moyen	Type de prélèvement
Groupe 1	maladies infectieuses	VIH/Sida	36	27	9	38,83 ans	Salive
Groupe 2	stomatologie	Parodontite /Gingivite	29	19	13	44,24ans	Salive Tartre Plaque dentaire Biofilm
Groupe 3	parasitologie-mycologie	Symptômes variables Buccaux et autres	11	6	5	31,64 ans	Salive

I.2. Matériel non biologique (voir annexe 1)

II. Méthodes

II.1. Prélèvements

Les prélèvements utilisés ont été réalisés à l'aide d'un écouvillon pour la salive. Pour les autres prélèvements, nous avons procédé à un prélèvement à la curette stérilisée raclant le tartre, la plaque dentaire, et le biofilm. Ces prélèvements ont été stockés dans du PBS.

Nous avons utilisé deux écouvillons pour chaque patient, l'un pour l'examen direct et la culture et l'autre pour l'étude moléculaire.

II.2. Examen direct

Nous avons effectués pour chaque patient :

- Deux observations microscopiques à l'état frais.
- Deux lames pour la coloration.

Afin de chercher les protozoaires *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax*.

II.2.1. Examen à l'état frais

Une goutte de solution PBS avec l'échantillon est placée entre lame et lamelle. La lecture est faite au G X 40

II.2.2. Examen après coloration

Cet examen a été aussi réalisé sur des frottis colorés au May-Grunwald-Giemsa (MGG) après confection des frottis par le Kit RAL 555 selon le procédé suivant :

- Mettre le frottis dans le fixateur (fix-Ral) pendant 1 min
- Puis dans le colorant Eosine-Ral pendant 25 s.
- Ensuite dans le colorant Bleu-Ral pendant 45 s.
- Enfin, on a fait un lavage, rinçage, séchage des frottis
- la lecture avec une goutte d'huile à émulsion au GX 100

II.3. Culture

Une fois que les échantillons ont été transportés au laboratoire. Ces derniers ont étéensemencés sur gélose Sabouraud + chloramphénicol, puis incubés 24-48 heures à 37°C dans une étuve pour but de chercher les levures dans ces échantillons. Une observation microscopique de ces cultures est effectuée après 72 heures :

Une colonie est prélevée puis déposée sur une lame contenant une goutte de bleu de méthylène. La lecture est effectuée à G X 40

Pour identifier les *Candida*:

- Nous devons effectuer un repiquage de la culture de 24 H à 25°C sur milieu Rice Cream sur lequel les *Candida* produisent des chlamydozoïdes.
- La présence des chlamydozoïdes est caractérisée pour les *C. albicans* et les *C. dubliniensis*, et pour différencier les *C. albicans* des autres *Candida*, nous devons passer au test d'Auxacolor™2.

II.3.1. Le test d'assimilation des sucres : Auxacolor™2 (voir Annexe)

Auxacolor™2 : plaques des copules pour identifier les levures.

- Prélever avec une pipete pasteur deux colonies et les mettre dans les petits tubes contenus dans le Kit d'Auxacolor™2.
- Mélanger avec le vortex.
- Prélever avec une micro-pipete 100 µl et remplir tous les copules d'auxacolor™2 (1 prélèvement dans chaque copule)
- Couvrir par l'adhésif : laisser dans l'étuve à 25°C.
- Après 24 h, effectuer la lecture.

II.3.2. Liste des sucres testés par Auxacolor™2 : (voir Annexe)

II.4. Etude moléculaire

II.4.1. Extraction d'ADN

Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode d'extraction par Kit Qiagen réalisé sur 76 échantillons à partir des prélèvements de salive, de tartre et de biofilm après dilution dans le PBS.

II.4.1.1. Kit Qiagen

Extraction d'ADN à partir de la salive à l'aide du Kit Qiagen (protocole pour le sang et les autres fluides biologiques)

II.4.1.1.1. Principe

Le principe repose sur la filtration et l'adsorption de l'ADN sur une membrane en gel de nature silice-silica par des centrifugations successives, la pureté de l'ADN est assurée par des solutions de lavage et des sels fournis avec le Kit permettant d'éliminer les protéines et autres contaminants.

II.4.1.1.2. Protocole de l'extraction

- Allumer le bain marie à 56°C.
- Ajouter 500 µl H₂O au culot des globules blanc, et mélanger énergiquement à l'aide de micropipette jusqu'à dissolution complète du culot.
- Dans un microtube de 1,5 ml, mettre :
 - 10ul de protéinase K.
 - 200ul de tampon de lyse (AL).
 - 200ul de culot de globules blancs suspendu.
- Vortexer 10-20 secondes et mettre au bain marie à 56°C pendant 30 mn en vortexant chaque 5 mn.
- Retirer le microtube du bain marie.
- Ajouter 200 ul d'éthanol 100%, puis vortexer et transférer sur une colonne Qiagen.
- Centrifuger 3 mn à 10 000 trs, puis jeter les déchets et remettre la colonne sur une nouvelle poubelle.
- Ajouter 500 µl de tampon de lavage AW1 et centrifuger 3 mn à 10 000 trs. Jeter la poubelle et remettre la colonne sur une nouvelle poubelle.
- Ajouter 500 µl de tampon de lavage AW2.
- Centrifuger 3 mn à 10 000 trs, puis jeter la poubelle et remettre la colonne sur un nouveau microtube.
- Ajouter 300 µl d'eau distillée stérile et laisser le tube en position verticale durant 3 mn puis centrifuger 3 mn à 10 000 trs.
- Conserver les extraits à -20°C jusqu'au jour d'amplification.

II.4.2. L'amplification de l'ADN**II.4.2.1. La Polymérase Chain Reaction**

Cette technique décrite par K. Mullis et al en 1985, a permis d'amplifier une courte séquence d'ADN cible à partir d'une infime quantité d'ADN génomique.

II.4.2.1.1. Principe

La PCR consiste à faire une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN d'une manière répétitive, elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotides complémentaires, des oligonucléotides qui serviront à délimiter la séquence d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces. Les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant.

II.4.2.1.2. Les étapes de la réaction d'amplification

A- Dénaturation

L'ADN double-brin à amplifier est dénaturé en deux molécules d'ADN simple-brin par chauffage. L'étape de dénaturation est réalisée à 95°C pendant 45s.

B- Hybridation

Cette étape se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces. Cette température dépend de la composition en bases des oligonucléotides, et de la T_m des amorces qui devra être calculée pour chaque PCR.

La température de la réaction est baissée à une valeur comprise entre 42°C et 68°C, et l'hybridation des amorces avec l'ADN simple-brin est réalisée. Cette étape dure de 30 secondes à 1 minute

C- Elongation

C'est l'étape de polymérisation, la synthèse d'ADN est réalisée par la Taq polymérase à une température de 72°C. Au cours de cette étape, la Taq polymérase introduit les dNTP du milieu réactionnel pour synthétiser une copie d'ADN double-brin. La synthèse se fait dans le sens 5' 3'. Il faut environ 1 min pour synthétiser un fragment de 1 kb.

Chaque série de ces étapes est appelée cycle, la durée de chaque cycle est d'environ 5 minutes. Une réaction de polymérisation en chaîne comporte de 25 à 30 cycles.

II.4.2.1.3. Protocole opératoire

A- Préparation du MIX

On prélève selon l'ordre des volumes allant du plus grand vers le plus petit, on commence par l'eau, puis le tampon, le MgCl₂, ensuite les amorces reconstituées, la Taq polymérase doit

être rajoutée en dernier pour éviter les amplifications aspécifiques (amorçage au hasard) qui proviennent d'une hybridation à température ambiante.

Une fois le mélange réactionnel préparé, on commence la distribution des extraits d'ADN. La distribution des extraits se fait avec une pipette et des embouts à filtres, tube après tube, sans jamais laisser deux tubes ouverts en même temps, afin d'éviter les contaminations inter échantillons. Juste après avoir mis la Taq, les manipulations doivent être rapides pour éviter la polymérisation lors de la préparation de l'échantillon.

Une fois la distribution terminée, on vortex pour permettre de récupérer les gouttelettes accolées aux parois des tubes et de bien mélanger les milieux. Durant cette étape, il est recommandé de mettre en marche le thermocycler pour atteindre la température de dénaturation (95°C), puis de mettre en pause avant qu'il n'entame le premier cycle.

B- Amplification

Une fois le thermocycler mis en pause, on introduit les échantillons, mais après avoir atteint la température de dénaturation qui dépasse les 90°C. Celle-ci est maintenue par le couvercle de l'appareil, elle permet d'éviter l'évaporation des échantillons et d'éviter les amplifications aspécifiques dues à l'activité de la Taq lors de l'augmentation de la température.

II.4.3. La révélation des produits PCR

Les amplicons sont révélés par une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose.

C'est une technique simple faite par un gel d'électrophorèse révélé au bromure d'éthidium. Cette méthode permet de contrôler la spécificité de l'amplification, et de vérifier que le produit de l'amplification correspond bien à la taille attendue.

II.4.3.1. Principe de l'électrophorèse

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode de biologie moléculaire qui permet de séparer l'ADN, l'ARN, ou des protéines en fonction de leur taille. C'est une technique d'analyse au cours de laquelle des échantillons d'acides nucléiques sont déposés dans un gel d'agarose immergé dans un tampon puis mis à migrer sous l'effet d'un champ électrique.

II.4.3.2. Protocole opératoire

II.4.3.2.1. Préparation du gel d'agarose à 2%

- Préparer un mélange de 300 ml constitué de 6 ml de TAE (Tris-Acétate-EDTA) + 294 ml d'eau distillée dans un bécher.
- Mettre ce mélange dans une fiole erlenmeyer et rajouter 6 g d'agarose.
- Mélanger et mettre à la micro-onde pendant 5 min en remuant bien de temps à autre jusqu'à la dissolution complète d'agarose.
- Laisser refroidir, puis on rajoute 30 µl de BE.
- Couler le gel dans le moule et laisser refroidir un bon moment à température ambiante. Retirer les peignes et découper le gel selon le nombre de puits au besoin du nombre d'échantillons.
- Placer le gel dans la cuve.

Avant de placer le gel, il faut fixer le support et les peignes.

- Couler le gel dans la cuve et laisser refroidir à une température ambiante pendant 2 heures environ.
- Retirer les peignes et découper le gel selon le nombre d'échantillons à révéler.

II.4.3.2.2. Préparation et dépôts des amplicons

Dans les puits d'une plaque de microtitration, on met dans chaque cupule 3µl de colorant bleu de bromophénol, puis on rajoute 7µl de l'eau distillée, ensuite on rajoute 10µl des produits d'amplification dans chaque cupule sauf au niveau de la dernière cupule où on met 10µl de marqueur de taille moléculaire de type Promega (DNA Ladders Promega)

On dépose nos échantillons dans le gel du côté de la cathode ce qui va permettre leur migration vers l'anode.

II.4.3.2.3. Migration

La durée de migration est proportionnelle à l'épaisseur du gel, à la quantité de tampon dans la cuve et à la taille de la séquence à révéler. La durée moyenne de migration à une tension 79V, est d'environ 45 minutes pour les (EGO1/EGO2) 1400 Pb et (PT3/PT7) 800 Pb. Quand le front de migration atteint l'extrémité du gel à environ 2 cm, la migration est arrêtée.

II.4.4. Lecture et interprétation des résultats

Le gel est transféré sur une table à UV, qui permet une bonne visualisation des bandes de migration grâce à l'absorption des UV par le bromure d'éthidium (BET) intégré entre les bases nucléotidiques, dans une chambre sombre.

La validation de la technique se fait par rapport au témoin positif, au témoin négatif et au marqueur de taille.

II.5. Mise au point de la PCR pour *Entamoeba gingivalis*

II.5.1. Les amorces EGO-1/EGO-2

L'amorce utilisée dans ce travail (EGO-1/EGO-2) spécifique pour le gène de la petite sous unité ribosomale de l'ARN (SSU ADNr) d'*Entamoeba gingivalis*.

- EGO-1 : 5'-GAATAGGCGCATTTCGAACAGG-3'
- EGO-2 : 5'-TCCCAGTAGTAAGGTACTTACTC-3'

Tableau 4 : Caractéristiques des amorces (EGO-1/ EGO-2) et (PT3/ PT7)

Caractéristiques	EGO-1	EGO-2
Longueur	22b	23b
%GC	50%	43%
Tm (°C)	57	53
PM (g/mol)	6808.5	6808.5
Température d'hybridation théorique (°C)	48	
Taille (Pb)	1400	

II.5.2. La réaction d'amplification des amorces Ego 1 / Ego 2

L'amplification a été réalisée selon le protocole proposé par Cembranelli et al. 2013. Dans un volume total de 50 µl contenant :

- 1.5 mM de MgCl₂.

- 0.2 mM de dNTPs
- 0.2 µM de chacune des amorces.
- 2.5 U de *Taq* polymerase.
- Tampon d'amplification X1.

Tableau 5 : Constituants du MIX pour la PCR Ego 1 / Ego 2 (volume final de 50µl)

Constituants	H2O	Tampon 10X	Mgcl2	dNTP	Amorce1	Amorce2	Taq pol	répartir	ADN
PCR 50 µl	31 µl	5 µl	1.5 µl	1 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	40 µl	10 µl

Programme de la PCR

- **Dénaturation initiale** 94°C / 4 min
 - **Dénaturation** 94°C / 1 min
 - **Hybridation** 60°C / 1 min
 - **Elongation** 72°C / 1 min
 - **Elongation finale** 72°C / 4 min
- } 40 cycles

En absence de témoin positif, nous avons sélectionné des patients ayant une symptomatologie en faveur de la présence d'*Entamoeba gingivalis* et afin de valider la réaction PCR, la recherche de la bande 1400 pb était indispensable.

Nous avons lancé des PCR gradients avec 8 températures (53°C ,54°C ,55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C) de l'échantillon 71 en double au total 16 PCR. (Voir tableau 6).

Tableau 6 : gradient température PCR (Ego 1 / Ego 2)

	C1	C2	V1	V2	16 PCR
Tampon	10×	1×	5 µl	50 µl	80 µl
dNTP	10 mM	0.2 mM	1 µl	50 µl	16 µl
MgCl2	50 mM	1.5 mM	1.5 µl	50 µl	24 µl
Ego 1	20 µM	0.2 µM	0.5 µl	50 µl	8 µl
Ego 2	20 µM	0.2 µM	0.5 µl	50 µl	8 µl
TAQ	5 U	2.5 U	0.5 µl	50 µl	8 µl
H2O			31 µl	50 µl	496 µl

II.6. Mise au point de la PCR PT3 /PT7 pour *Trichomonas tenax*

Notre choix a porté sur l'amorce PT3 /PT7, le protocole appliqué dans notre travail est celui de Kikuta et al 1996.

II.6.1. Les amorces PT3 /PT7

L'amorce (PT3 /PT7) cible les gènes qui codent pour une région de la sous unité ARNr18S de *Trichomona tenax*.

- PT3 : 5'-AGTTCCATCGATGCCATTC-3'
- PT7 : 5'-GCATCTAAGGACTTAGACG-3'

Tableau 7 : Caractéristiques des amorces (PT3/ PT7)

Caractéristiques	PT3	PT7
Longueur	19b	19b
%GC	47%	47%
Tm (°C)	53	50
PM (g/mol)	5738.8	5738.8
Température d'hybridation théorique (°C)	45	
Taille	800	

II.6.2. La réaction d'amplification des amorces PT3 / PT7

Les réactions d'amplification des amorces PT3 / PT7 de *Trichomonas tenax* ont été réalisées dans un volume total de 50 µl selon Kikuta et al. 1996. contenant :

- 1.5 mM de MgCl₂.
- 50 µM de dNTPs
- 0.2 µM de chacune des amorces.
- 2.5 U de *Taq* polymerase.
- Tampon d'amplification X1.

Tableau 8 : Constituants du MIX pour la PCR PT3 /PT7 dans un volume final de 50µl

Constituants	H2O	Tampon 10X	Mgcl2	dNTP	Amorce1	Amorce2	Taq pol	répartir	ADN
PCR 50 µl	28 µl	5 µl	3µl	2.5µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	40 µl	10 µl

Programme de la PCR

- | | | |
|--------------------------------|--------------|-------------|
| ➤ Dénaturation initiale | 94°C / 4 min | |
| ➤ Dénaturation | 94°C / 1 min | } 35 Cycles |
| ➤ Hybridation | 58°C / 1 min | |
| ➤ Elongation | 72°C / 1 min | |
| ➤ Elongation finale | 72°C / 4 min | |

En absence de témoin positif, nous avons sélectionné des patients ayant une symptomatologie en faveur de la présence de *Trichomonas tenax* et afin de valider la réaction PCR, la recherche de la bande 800 pb était indispensable.

I. Résultats des examens directs en protozoologie

L'examen direct et les frottis colorés n'ont montré aucune forme d'*Entamoeba gingigalis* ou de *Trichomonas tenax*. L'examen s'est révélé négatif.

II. Résultats mycologiques

Les examens mycologiques ont réalisés pour tous les patients prélevés.

II.1. Résultats de l'examen direct (ED)

L'ED à la recherche des corps de levure est effectué systématiquement pour tous nos patients. Sur les 76 patients par rapport à la présence des levures. L'ED était positif chez 34 patients, soit 44,74% et négatif chez 42 patients soit 55,26% (Tableau 9).

Tableau 9 : Examen direct selon la clinique

	clinique	N patients	Examen direct positif	Examen direct négatif
Groupe 1	VIH/Sida	36	19	17
Groupe 2	Parodontite /Gingivite	29	08	21
Groupe 3	Symptômes variables Buccaux et autres	11	07	04

II.2. Recherche des levures *Candida* par culture Rice cream

La culture pour la recherche des levures (genre *Candida*) est pratiquée régulièrement pour les patients positifs pour l'ED. Nous avons utilisé le milieu de culture Rice cream. Sur les 34 patients, la culture est revenue positive chez 27 patients soit 79,41% et négative chez 7 patients soit 20,59% (Tableau 10).

Tableau 10 : Recherche des levures par culture Rice cream.

	clinique	N patients	Culture positif	Culture négatif
Groupe 1	VIH/Sida	19	15	4
Groupe 2	Parodontite /Gingivite	08	07	1
Groupe 3	Symptômes variables Buccaux et autres	07	05	2

II.2. Résultats de l'identification des levures par Auxacolor

Le test d'assimilation des sucres pour la recherche des levures du genre *Candida* spécifiques est effectué sur les 27 patients qui étaient positifs selon la clinique de la culture Rice Cream, 25 positifs soit 92,59 % (Tableau 11).

Tableau 11 : Identification des levures par Auxacolor™2

	clinique	N patients	Test positif	Test négatif	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
Groupe 1	VIH/Sida	19	13	6	10	02	01	00
Groupe 2	Parodontite /Gingivite	8	07	01	02	04	00	01
Groupe 3	Symptômes variables Buccaux et autres	7	05	02	05	00	00	00

Sur les 25 cas positifs par le test d'Auxacolor, nous avons obtenu 17 patients porteurs de *C.albicans*, 6 porteurs de *C.dubliniensis*, 1 patient porteur de *C.tropicalis* et 1 autre porteur de *C.glabrata* (fig.7)

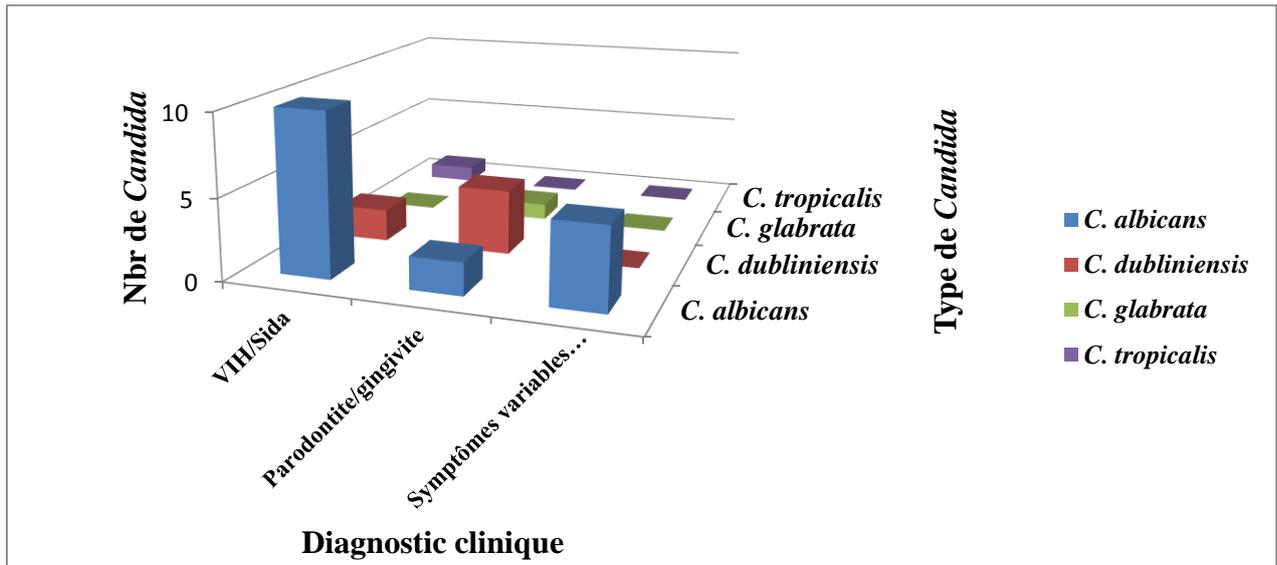


Figure 7 : Résultats d'Auxacolor™

- Les levures du genre *Candida* sont les plus fréquemment rencontrées dans la cavité buccale.
- L'espèce la plus souvent rencontrée est *C. albicans* mais d'autres espèces ont été identifiées.
- Le groupe VIH/Sida regroupe les fréquences les plus élevées.

III. Mise au point des PCRs pour l'identification moléculaire d'*Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax*

III.1. *Entamoeba gingivalis*

En appliquant le protocole de Cembranelli et al en 2013. Nous avons remarqué la formation de plusieurs bandes aspécifiques (fig.8).

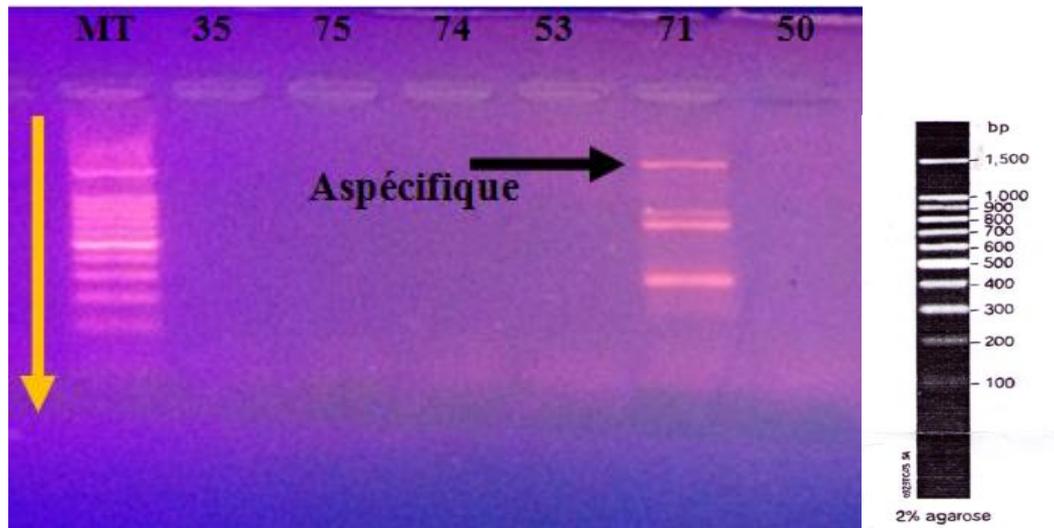


Figure 8 : Résultat PCR Ego1/Ego2.

A partir de ces résultats, nous étions obligés de faire une optimisation et nous avons commencé par la recherche de la température d'hybridation.

Les PCR gradients avec 8 températures de l'échantillon 71 (qui donne des bandes aspécifiques) en double au total 16 PCR montrent les résultats suivants (Voir figure 9).

Le programme d'amplification a subi des modifications qui ont porté essentiellement sur la T° d'hybridation (Figure 9).

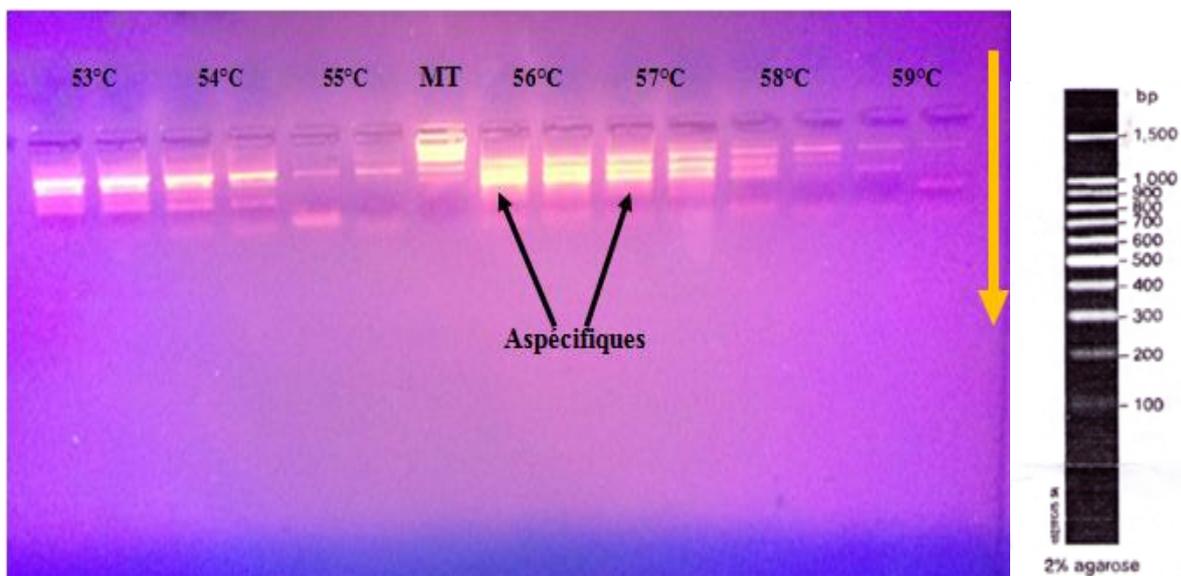


Figure 9 : Résultats PCR gradient Ego 1 / Ego 2

D'après ces résultats la température d'hybridation idéale est de 55°C.

III.2. *Trichomonas tenax*

Afin de valider la réaction PCR, il faut visualiser une bande de 800 pb. Le protocole appliqué est celui de Kikuta et al., 1996. Nous avons remarqué la formation d'une bande spécifique unique (Fig.10).

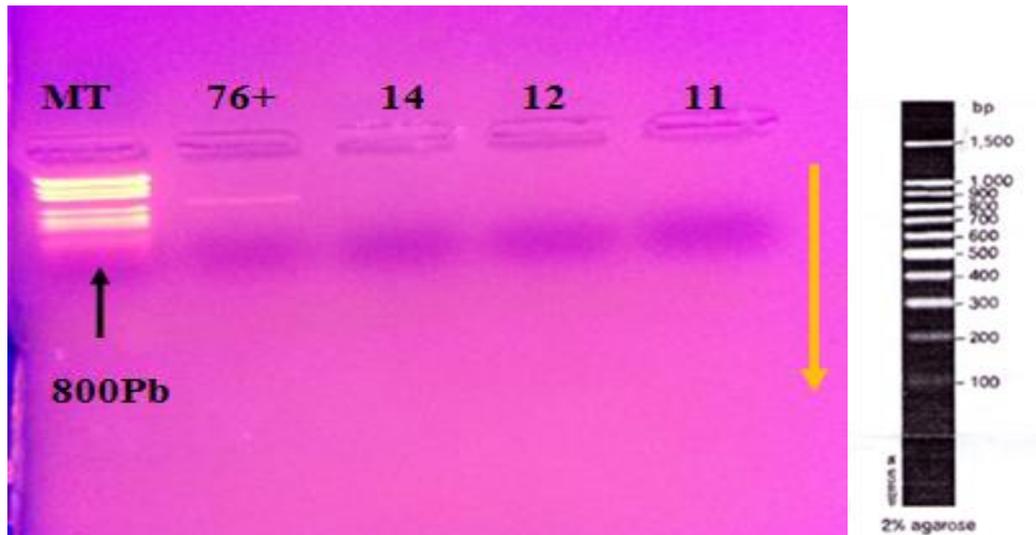
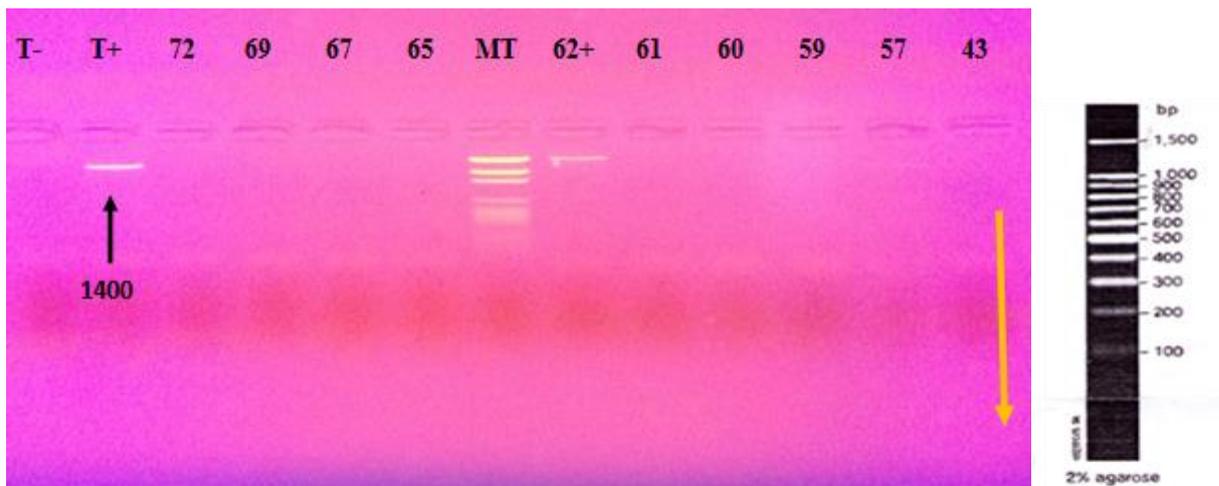


Figure 10 : Résultats PCR PT3/PT7 dans une température de 58°C.

IV. Diagnostic moléculaire (PCR)

IV.1. Résultats de la PCR pour *Entamoeba gingivalis*

Nous considérons un résultat de PCR comme positif pour *Entamoeba gingivalis* s'il y a apparition d'une bande de 1400 Pb, après électrophorèse sur gel d'agarose (Fig.11).



MT : Marqueur de taille ; T- : Témoin négatif ; T+ : Témoin positif ; + : résultat positif

Figure 11 : Résultats PCR EGO1/EGO2

Tableau 12 : Caractérisation moléculaire par PCR EGO1/EGO2 selon le protocole décrit par Cembranelli et al., 2013

	clinique	N patients	PCR positif	PCR négatif
Groupe 1	VIH/Sida	36	08	28
Groupe 2	Parodontite /Gingivite	29	01	28
Groupe 3	Symptômes variables Buccaux et autres	11	00	11

La recherche d'*Entamoeba gingivalis* au niveau des échantillons dans les 3 groupes d'étude a donné les résultats suivants (fig.10).

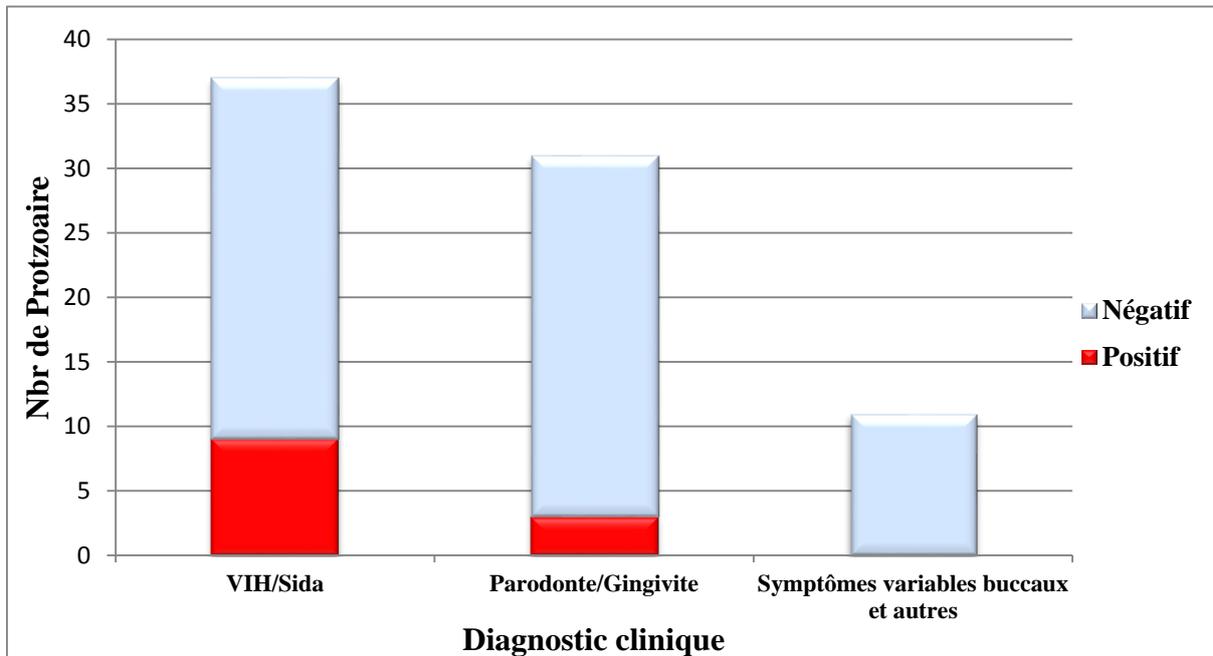


Figure 12 : Résultats de la PCR EGO1/EGO2

- *Entamoeba gingivalis* semble présente chez 8 patients (22,22%) sur les 36 sujets du groupe VIH/SIDA.
- Une positivité chez 1 patient (3,45%) sur les 29 sujets du groupe ayant une Parodontite ou une Gingivite.
- La recherche d'*Entamoeba gingivalis* au niveau du groupe ayant des symptômes variables buccaux et autres n'ont donné aucun résultat positif sur les 11 sujets de ce groupe.

Le Tableau 13 est une illustration des résultats mycologiques correspondants aux 9 cas positifs pour *Entamoeba gingivalis*.

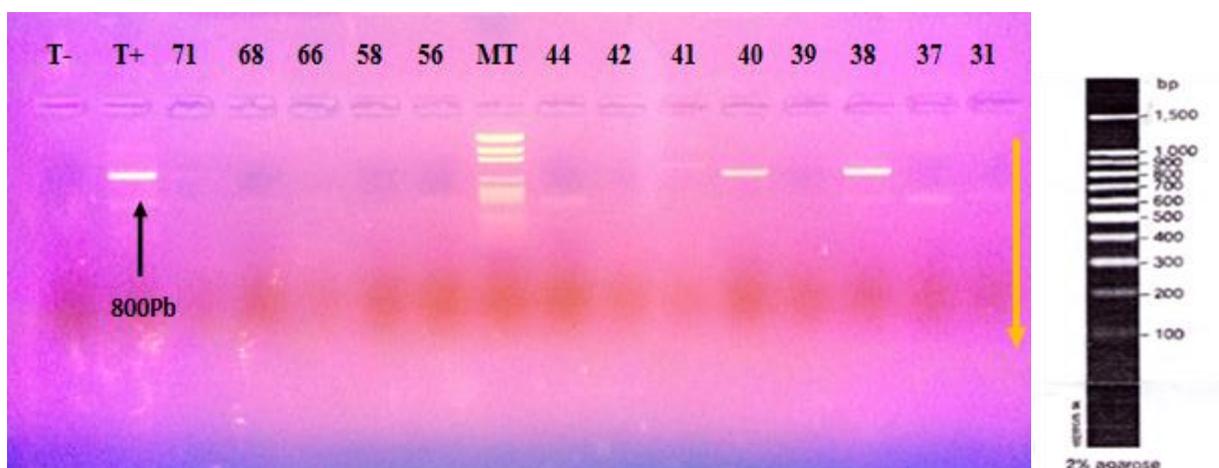
Tableau 13 : Résultats mycologiques correspondant aux résultats positifs par la PCR pour *Entamoeba gingivalis*

Numéro de patient	Age	Sexe	Clinique	Examen Direct	Culture	Auxacolor™2	PCR EGO1/EGO2
27	27	M	VIH/Sida	-	-	-	+
28	55	M	VIH/Sida	+	+	<i>C. albicans</i>	+
32	49	F	Parodontite / Gingivite	+	+	<i>C. albicans</i>	+
44	37	M	VIH/Sida	-	-	-	+
56	32	F	VIH/Sida	-	-	-	+
57	30	M	VIH/Sida	-	-	-	+
58	35	F	VIH/Sida	-	-	-	+
62	31	M	VIH/Sida	+	+	-	+
71	44	F	VIH/Sida	+	-	-	+

Parmi les 9 cas positifs pour la PCR pour l'*Entamoeba gingivalis*, nous avons trouvé que 2 patients étaient porteurs de *C. albicans*.

IV.2. Résultats de la PCR pour *Trichomonas tenax*

Nous considérons un résultat de PCR comme positif s'il y a apparition d'une bande de 800 Pb typique pour *Trichomonas tenax* après une électrophorèse sur gel d'agarose (Fig.13).



MT : Marqueur de taille ; T- : Témoin négatif ; T+ : Témoin positif

Figure 13 : Résultat PCR PT3/PT7 dans une température de 58°C.

Tableau 14 : Caractérisation moléculaire par PCR PT3/PT7 selon le protocole décrit par Kikuta et al., 1996.

	clinique	N patients	PCR positif	PCR négatif
Groupe 1	VIH/Sida	36	02	34
Groupe 2	Parodontite /Gingivite	29	01	28
Groupe 3	Symptômes variables Buccaux et autres	11	01	10

La recherche de *Trichomonas tenax* au niveau des échantillons dans les 3 groupes d'étude a donné les résultats suivants (fig.14).

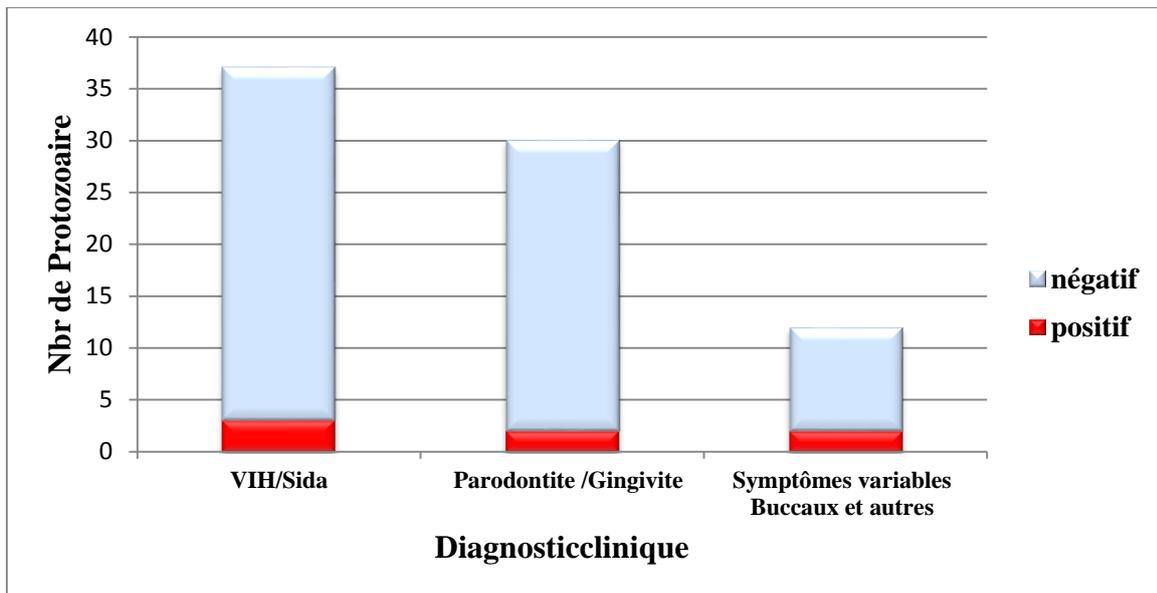


Figure 14 : Résultats de la PCR PT3/PT7.

Trichomonas tenax semble présent chez :

- 2 patients (5,55%) sur les 36 sujets du groupe VIH/SIDA.
- 1 patient (3,45%) sur les 29 sujets du groupe ayant une Parodontite ou une Gingivite.

- 1 patient (9,09%) sur les 11 sujets du groupe ayant des symptômes variables buccaux et autres.

Les 4 résultats positifs pour *Trichomonas tenax* correspondent à des individus de sexe masculin.

Le tableau 15 représente les résultats mycologiques correspondant aux patients présentant des *Trichomona tenax*.

Tableau 15 : Résultats mycologiques correspondant aux patients présentant des *Trichomona tenax*.

Numéro de patient	Age	Sexe	Clinique	Examen Direct	Culture	Auxacolor™2	PCR EGO1/EGO2
23	60	M	Parodontite / Gingivite	-	-	-	+
38	27	M	VIH/Sida	-	-	-	+
40	39	M	VIH/Sida	+	+	<i>C. albicans</i>	+
76	70	M	Symptômes variables (Buccaux et autres)	+	+	<i>C. albicans</i>	+

Nos résultats montrent que :

- les amibes sont légèrement plus fréquentes que les *trichomonas tenax*
- les levures du genre *candida* sont les plus fréquemment rencontrées dans la cavité buccale.
- La recherche des protozoaires et des champignons est effectuée parallèlement et nous remarquons que les protozoaires sont volontiers associés à la présence des levures. En effet, celles-ci peuvent leur servir d'éléments nutritifs.

Le manque de standardisation de la technique PCR pour le diagnostic de l'*Entamoeba gingivalis* et du *Trichomonas tenax* a ouvert les portes à la recherche génomique.

La plasticité génomique des parasites en général et celle de l'*Entamoeba gingivalis* et du *Trichomonas tenax* en particulier, laisse le champ libre à la recherche des cibles génétiques ainsi qu'aux techniques de leur mise en évidence.

Initialement ; les techniques de PCR coutaient chers et étaient lourdes à mettre en œuvre. Celles-ci sont maintenant devenues des outils relativement abordables, sûrs, et d'emploi facile dans certains laboratoires de diagnostic et cela ne dépend que des objectifs et des moyens nécessaires.

L'*Entamoeba gingivalis* et le *Trichomonas tenax* sont deux protozoaires qui vivent dans la cavité buccale. Certains auteurs les considèrent comme des organismes commensaux chez l'homme, d'autres comme des organismes pathogènes.

Notre étude a porté sur 76 échantillons de salive, de tartre et de plaque dentaire collectés au niveau du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Central de l'Armée. Ces échantillons ont été analysés par un examen direct, une culture pour la recherche des champignons microscopiques, une identification des levures par Auxacolor et la PCR pour la recherche de l'ADN des protozoaires.

➤ Examen direct pour la détection de l'*Entamoeba gingivalis*

La mise en évidence du parasite dans un prélèvement par observation microscopique manque de sensibilité, ne permettant pas de détecter le parasite de manière efficace. Cette faible sensibilité est liée aux conditions de déroulement de ce test, de la réalisation des prélèvements en matière de : qualité et de quantité (traitement reçu qui diminue la charge parasitaire et distribution irrégulière des amibes)...etc.

Dans notre travail, en l'absence d'études approfondies, l'examen direct s'est révélé négatif chez tous les patients prélevés, cela est due à la faible sensibilité de ce dernier, la sensibilité est en fonction de la qualité et de la technique du prélèvement mais aussi de la charge parasitaire (prélèvement pauci-parasitaire) (Huang et al., 2009), de la fragilité et de la sensibilité de ces deux parasites (survie au maximum 2 heures en dehors de la bouche), et d'autres facteurs iatrogènes (alimentation, traitement, hygiène buccal...etc), de l'état immunitaire, d'autant plus que c'est un examen fastidieux qui nécessite un œil entraîné, des colorations spécifiques avec des modalités de mise au point appropriées.

Les résultats obtenus dans notre étude sont en contradiction avec ceux avancés par certains auteurs. En effet, l'étude de Athari et ses collaborateurs en 2007 faite en Iran, rapporte une prévalence de 69/160 (43,1%) par étude microscopique, chez des malades parodontales. Cembranelli et ses collaborateurs en 2013 au Brésil, ont montré une prévalence de 30/82 (36,6%) par microscope optique chez des malades VIH/Sida. Une autre étude basée sur l'observation microscopique (Trim et al, 2011), a montré que la prévalence moyenne des protozoaires était de 62% (62 échantillonnages étaient positifs sur un total de 100 échantillons)

L'examen direct n'a donc que peu d'intérêt, hormis celui de l'information et de la prise de conscience du patient du fait de l'existence de ces parasites buccaux.

Cependant, *Entamoeba gingivalis* est un parasite très polymorphe pouvant être confondue avec d'autres structures cellulaires (Kikuta et al., 1996) telles que les macrophages également capables d'effectuer la phagocytose, ce qui peut avoir induit un diagnostic faussement positif dans un examen microscopique par l'observateur (DAO et al., 1983).

➤ **Diagnostic moléculaire (PCR)**

La Polymérase Chain Reaction (PCR) a été introduite avec succès et s'est avérée être l'outil moléculaire le plus sensible pour la détection directe et la caractérisation du parasite *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax* dans des échantillons cliniques.

La PCR offre une précision et une sensibilité élevée par rapport à l'examen direct ; néanmoins et selon certaines études (Kikuta et al. 1996), elle dépend du seuil de détection des amorces, du type d'échantillons prélevés, ainsi que du type de PCR.

➤ **Choix du protocole d'amplification**

La mise au point d'un diagnostic basé sur les techniques de biologie moléculaire commence par le choix de l'ADN cible, qui constitue une étape cruciale, et permet de choisir un protocole réalisable, rapide, reproductible, et moins coûteux.

Il existe plusieurs protocoles d'amplification appliqués par différents laboratoires. Bien qu'ils partent du même principe, ils révèlent de nombreuses différences concernant les types d'amorces, leurs concentrations, le nombre de cycles, les températures de chaque étape...etc.

Notre choix a porté sur les paires d'amorces EGO1/EGO2 et PT3/PT7. Le programme d'amplification a subi des modifications qui ont porté essentiellement sur la Température d'hybridation. Le protocole appliqué dans notre travail est celui de Cembranelli SBS et al en 2013 pour les amorces EGO-1/EGO-2 et de N. Kikuta et al en 1996 pour les amorces PT3 /PT7.

Dans notre travail, la PCR s'est révélée positive dans 9 cas sur 76, soit 12% pour l'*Entamoeba gingivalis*.

Les résultats de recherche d'*Entamoeba gingivalis* dans les échantillons prélevés aboutissent à une positivité élevée dans le groupe VIH/SIDA, alors qu'un seul patient infecté par cette amibe dans le groupe de patients ayant une Parodontite ou une Gingivite, tandis que tous les sujets du groupe ayant des symptômes variables buccaux et autres donnent des résultats négatifs.

Le taux de positivité global du groupe VIH/SIDA est de 22,22% et celui du groupe Parodontite/Gingivite est de 3,45%, ce qui montre une fréquence plus élevée chez les patients du groupe VIH/Sida.

En comparant les résultats obtenus avec les résultats d'études similaires : Nos résultats sont comparable a ceux de Ghabanchi et al en 2008 en Iran qui rapportent sur 100 sujets étudiés (50 sujets avec parodontite et 50 sujets sans parodontite), une prévalence d'*Entamoeba gingivalis* de 12% au niveau du groupe « Patients » et de 2% seulement au niveau du groupe « Contrôle ».

D'autres auteurs décrivent une forte prévalence d'*Entamoeba gingivalis* qui peut être liée à certains facteurs tels que la qualité de l'hygiène bucco-dentaire, le tabagisme, le saignement des gencives, la présence de caries, la formation de tartre, la mobilité des dents, la poche parodontale, le microbiote associé...etc. (Annan, et al, 1993 ; Mendoza et al 2003 ; Gharavi et al, 2006).

Une étude réalisée par Cembranelli en 2010 a signalé que la fréquence d'*Entamoeba gingivalis* évaluée sur un échantillon de 177 sujets a été de 33,3% (59/177) des patients. Il y avait une variabilité significative de la fréquence en fonction de la population étudiée, ce qui démontre une positivité plus élevée dans le groupe clinique des VIH / sida, suivis par le groupe des patients atteints de la maladie parodontale. Nos résultats rejoignent ceux de

Cembranelli concernant le fait que les patients du VIH / SIDA ont une plus grande quantité de trophozoïtes d'*Entamoeba gingivalis* dans la cavité buccale.

Une autre étude réalisée aux USA par Trim et al en 2011, rapporte une fréquence de 7/26 (27%) de positifs pour l'*Entamoeba gingivalis* par PCR conventionnelle, et une fréquence de 18 / 26 (69%) de positifs pour *Entamoeba gingivalis* par PCR en temps réel chez des patients avec parodontites.

Des études menées par Cembranelli et al en 2013 sur un total de 82 malades VIH (+) /SIDA (51hommes et 31femmes) déterminent une positivité de 63,4% (52/82) par PCR conventionnelle, plus élevés par rapport à celle retrouvé dans notre travail.

La présence d'*Entamoeba gingivalis* est dépendante de l'âge (Ghabancchi et al., 2010). La plupart des données de la littérature suggèrent que les personnes de plus de 30-40 ans sont plus porteurs de cette amibe qui est à peine retrouvée chez les enfants et les adolescents, (Checová et al., 1987 ; Vrablic et al., 1992).

Dans l'étude de Cembranelli en 2010, ils ont observé que la présence du parasite était plus évidente après 35 ans et ceci est soutenu par la majorité des auteurs (Kofoid, 1929 ; Wantland et Lauer, 1968 ; Gharavi et al 2006)

Les résultats sont controversés en ce qui concerne la prédilection d'*Entamoeba gingivalis* par rapport au sexe des individus. Certains auteurs (Vrablic et al, 1991 ; Huang et al., 2009) ont indiqué que cette espèce d'amibe est plus fréquente chez les individus masculins, d'autres auteurs (El Hayawan et Bayoumy, 1992 ; Ghabancchi et al., 2010) mettent en évidence une plus grande fréquence chez les femmes, et certains décrivent des proportions similaires chez les femmes et les hommes (Checová et al, 1987;. Junior et Machado, 1995 ; Cuevas et al. 2006). Notre étude révèle une plus grande prononciation du parasite chez les hommes, ce qui est corroboré par l'étude de Huang et al., 2009.

Afin d'expliquer le taux important de cette amibe chez les patients atteints de maladies parodontales, il y a plusieurs défis à relever pour pouvoir déterminer le rôle exact de l'*Entamoeba gingivalis* dans cette maladie (Gannon et Linke, 1992). Le lien causal entre la présence du parasite et le développement de la parodontite n'a pas été encore démontré. Cependant, dans l'étude de Bornner et al, 2014 ; de Ghabanchi et al 2008 et d'après le travail

de Kikuta et al, 1996, il a été démontré que l'*Entamoeba gingivalis* est rarement détectée chez les sujets sains.

La prévalence de cette maladie est encore à déterminer, elle varie de 6,9 à 86,4% en fonction de plusieurs facteurs, à savoir, l'âge, le sexe et la situation géographique (Cambon, 1979 ; Chen et al. 2000 ; Gharavi et al., 2006 ; Caves et al., 2006).

La maladie parodontale peut être un reflet de l'interaction entre plusieurs agents étiologiques et les facteurs de l'environnement.

De même, les résultats de l'enquête de Trim aux USA en 2011 aident à évaluer le rôle étiologique potentiel d'*Entamoeba gingivalis* dans la maladie parodontale.

L'étude de Bonner et al 2014, nous a permis de mettre en évidence et sans équivoque que l'infection par l'*Entamoeba gingivalis* et la parodontite sont corrélées. Cela ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension et le contrôle de cette maladie, et éventuellement les pathologies associées, étant donné que la parodontite est l'une des maladies les plus répandues dans le monde.

Chez l'Homme *Entamoeba gingivalis* est un parasite très commun, son identification donne une nouvelle cible aux tentatives thérapeutiques. Les traitements anti-parasitaires chez l'homme, le suivi des patients et l'expérimentation chez l'animal permettront de connaître le lien étiologique entre l'*Entamoeba gingivalis* et la parodontite.

Les techniques moléculaires sont plus sensibles pour le diagnostic de différents micro-organismes, y compris *Entamoeba gingivalis*, surtout lorsqu'on les compare avec un examen direct (Yamamoto et al., 1995 ; Kikuta et al., 1996).

La spécificité de la PCR conventionnelle montre que l'ADN amplifié à partir des cultures de laboratoire de l'*Entamoeba gingivalis* et des échantillons cliniques a été précédemment rapporté par Kikuta et al., 1996. Lors d'un essai avec neuf autres espèces de protistes (y compris espèces de l'*Entamoeba*), dix espèces de bactéries orales, et des leucocytes humains, aucun produit de PCR de n'importe quelle longueur n'a été produit. Ainsi, les amorces utilisées (EGO-1 et EGO-2) ont été considérées comme spécifiques pour *Entamoeba gingivalis*.

La PCR réalisée avec des amorces spécifiques (EGO-1 et EGO-2) pour le gène de la petite sous unité SSU ARNr d'*Entamoeba gingivalis* s'est révélée efficace pour le diagnostic d'échantillons qui étaient négatifs à l'examen direct.

➤ *Trichomonas tenax*

➤ Examen direct pour la détection de *Trichomonas tenax*

Dans notre étude, l'examen direct pour la détection de *Trichomonas tenax* s'est révélé négatif chez tous les patients prélevés. Nos résultats sont corroborés par l'étude de Kikuta et al en 1996 qui ont signalé que chez 9 patients prélevés au niveau de la plaque dentaire, aucune forme de *Trichomonas tenax* n'a été observés par microscope.

➤ Diagnostic moléculaire (PCR)

Après la mise au point de la PCR, 4 patients sur 76, soit 5%, se sont avérés positifs pour le *Trichomonas tenax*.

Nos résultats sont corroborés par l'étude de Mahdi et Al Saeed (1993), Kharofa et al. (2006), Gharavi et al. (2006) et Ozcelik et al. (2010), qui ont montré une fréquence plus basse de *Trichomonas tenax* variant de 1% à 11,5%.

Cependant, des études réalisées au Japon (Kikuta et al., 1996) ont montré une fréquence de *Trichomonas tenax* plus élevée que dans notre échantillonnage signalant que chez 9 patients prélevés au niveau de la plaque dentaire, (55,5%) 5 étaient positifs pour *Trichomonas tenax*.

Une autre étude réalisée en Iran (Athari et al., 2007) a montré que 33/160 (20.6 %) étaient positifs pour *Trichomonas tenax* chez des patients ayant des gingivites ou des parodontites.

El Sibaei et ses collaborateurs en 2012 en Egypte ont détecté *Trichomonas tenax* chez (28,6%) 20/70 individus souffrant d'une parodontite et/ou d'une gingivite.

Wantland et Lauer en 1970 ont montré une positivité de 26,5% par *Trichomonas tenax* sur un total de 700 patients ayant une parodontite.

Feki et Molet en 1990, en France, ont trouvé sur un total de 300 patients une positivité de 28% pour *Trichomonas tenax*.

Mahdi et Al-Saeed AT 1993 en Iraq, suite à un examen de la salive de 143 patients avec poche parodontal rapportent une prévalence de 8,4 % de *Trichomonas tenax*.

Selon l'étude d'El Sibaei en 2012, la fréquence de la trichomonase buccale chez les patients ayant des infections buccales (28,6%) est comparable à la plupart des rapports publiés : 12% à 32% (De Leon et al, 2001;. Pardi et al., 2002;. Sarowska et al, 2004 ; Athari et al., 2007;

Ghabanchi et al., 2010; Juniors et al., 2011). Cependant, Kurnatowska et al en 2004 ont rapporté une fréquence plus élevée de *Trichomonas tenax* (37,4%).

Les résultats de recherche de *Trichomonas tenax* dans les échantillons prélevés aboutissent à une positivité de 5,55% dans le groupe VIH/SIDA, de 3,45% chez les patients ayant une Parodontite ou une Gingivite et une positivité de 9,09% chez les sujets du groupe ayant des symptômes variables buccaux et autres. Ceci montre une fréquence similaire chez les patients des 3 groupes d'étude.

De nombreux facteurs pourraient expliquer les différences ; y compris la taille de l'échantillon des patients examinés, la méthode utilisée pour la détection de ces parasites et le type d'échantillons analysés.

Il s'agit là des premier cas infecté par *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax* sur des malades VIH/Sida et parodontite/gingivite rapporté en Algérie. Le manque de données épidémiologiques des infections à *Entamoeba gingivalis* et à *Trichomonas tenax* est dû en grande partie à l'absence de recherche spécifique.

Conclusion

L'écosystème buccal est un milieu éminemment complexe, dont la population microbienne commence à être connue en détail ; mais les associations des protozoaires, fréquentes dans la bouche, sont encore mal précisées.

La parodontite est l'une des maladies les plus répandues dans le monde. Les Protozoaires *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax* posent le problème des porteurs sains de pathogènes supposés. Leur identification repose principalement sur des techniques parasitologiques directes pour la mise en évidence du parasite. Les progrès actuels proposent la détection de ces parasites grâce à des techniques de biologie moléculaire.

En Algérie, la recherche des protozoaires buccaux grâce aux techniques conventionnelles ne permet pas de poser un diagnostic clair chez les malades parodontales et chez les sujets VIH/Sida. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à ce sujet qui avait pour principal objectif, l'évaluation de l'apport de l'analyse moléculaire par amplification génique (PCR) par rapport aux techniques classiques (ED) dans le diagnostic d'*Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax*.

Au cours de ce travail, la recherche des protozoaires et des champignons a été effectuée parallèlement et nous avons pu remarquer que les protozoaires sont associés à la présence des levures. En effet, celles-ci peuvent leur servir d'éléments nutritifs. Il en sort de ce travail que les protozoaires buccaux (*Entamoeba gingivalis* et *Trichomona tenax*) sont répandus puisque 17% des sujets examinés étaient porteurs, avec une légères prédominance pour les amibes (*Entamoeba gingivalis*).

D'après nos résultats, la PCR que nous avons employé semble plus sensible dans la détection d'*Entamoeba gingivalis* et de *Trichomonas tenax* que l'examen direct.

La sensibilité de la PCR apportée dans notre travail prouve et démontre le grand apport de cette dernière dans la détection d'*Entamoeba gingivalis* et de *Trichomonas tenax* par rapport aux autres techniques.

Ce travail a permis de mettre en évidence que l'infection par *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax* chez des patients atteints de parodontite et de VIH/Sida semble en relation. Cependant aucun élément ne nous permet de le confirmer à l'heure actuelle.

Annexes

Annexe 1 : Matériel non biologique

1. Réactifs

➤ **Utilisé pour l'extraction**

Protéinase K, Ethanol, Eau distillé stérile et filtrée, PBS, QIAamp DNA Blood Mini Kit (KIT Qiagen)

➤ **Utilisé pour l'amplification**

Amorces (EGO 1 / EGO 2), Amorces (PT3 / PT7), dNTP, Taq polymérase, Tampon, MgCl₂

➤ **Utilisé pour l'électrophorèse**

TAE, Agarose, Bleu de bromophénol, Bromure d'éthidium, Marqueur de taille.

2. Milieux de culture

Milieu Rice cream, Milieu Sabouraud chloranphénicol

3. Consommable

Gants stérile sans talc, Eppendorfs, Portoir Eppendorfs, Microplaque.

4. Appareils

Microscope optique, Hôte à UV, Centrifugeuse, Bain-marie, Etuve, Thermocycler, Cuve de migration, Support de coulage, Micro-onde, Camera, appareil photo.

Annexe 2 : Caractéristique de Tampon TE

Tampon TE (Tris-EDTA) pH 7,6 Pour 100 ml d'eau distillé

Tris HCl [tris (hydroxyméthyl) aminométhane] 1 mol/l (12,1g)

EDTA (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra acétique) 0,1 mol/l (3,72 g)

Tampon TAE : Tris Acétate EDTA

TE 1x : Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8,5

TAE X50 :

Tris base : 242g
Acide acétique glacial : 57,1ml
EDTA 0,5M pH8 : 100ml
Eau qsp : 1000ml

TAE X1 : pour 1000ml

TAE X50 :20 ml

Eau 980ml

- **EDTA 0,5M pH8** : 186,1g d'EDTA dans 800ml d'eau distillé, ajuster le pH avec du NaOH

Tampon TBE (Tris borate EDTA) pH 8,3 : pour 1000ml d'eau distillée

Tris. HCl [hydroxyméthyl) aminométhane]	90mmol/l	10,89 g
Acide borique	90mmol/l	5,56 g
EDTA (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique)	2 mmol/l	0,74 g

Annexe 3 : Caractéristique de Bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium se présente sous la forme de cristaux de couleur rouge foncé, inodore.

Il est soluble dans l'eau (à raison de 5 g dans 100 ml d'eau à 20°C) et dans le trichlorométhane (1 g pour 750 ml à 20°C).

Ses principales caractéristiques physiques :

- Masse molaire : 394,32
- Point de fusion : 238-240°C

Annexes

Annexe 4 : Caractéristique de Bleu de bromophénol à pH 8

Pour 10 ml d'eau distillé

-Bleu de bromophénol	0,25 %
-Xylène cyanol	0,25 %
-Glucérol	130%

Le bleu de bromophénol est rajouté à raison de 3µl pour 10 µl de produits PCR

Densité (20/4) : 0,976

Solubilité : miscible avec de l'eau

Annexe 5: Caractéristique de la Protéinase K

La protéinase K est une enzyme protéolytique spécifique de l'hydrolyse de liaison peptidique entre acides aminés particuliers, elle est utilisée dans l'extraction d'ADN

Caractéristiques	Protéinase K
Tm optimal	25 à 65°C
Temps	Minimum 2h
PH	7,5
Conservation	(-15 à -20°C)/ 1 année
Stabilité de la forme lyophilisée	(+2 à +8°C)
Solubilité	20 mg/ml
Dénaturation	>65°C
Poids moléculaire	28930 Da

Annexe 6 : Constituants et conditions d'amplification des amorces EGO1/EGO2 selon le protocole décrit par Cembranelli et al. 2013 et PT3/PT7 selon le protocole décrit par Kikuta et al 1996.

Protocole	EGO1/EGO2	PT3/PT7
Constituants et conditions		
Mgcl2	1,5 mM	1,5 mM
dNTP μ M	200 μ M	50 μ M
Amorce 1	0,2 μ M	0,2 μ M
Amorce 2	0,2 μ M	0,2 μ M
Taq polymérase U/ μ l	2,5 U	2,5 U
Volume final	50 μ l	50 μ l
Dénaturation initiale	94°C (4min)	94°C (4min)
Dénaturation	94°C (1min)	94°C (1min)
Hybridation	55°C (1min)	58°C (1min)
Elongation	72°C (1min)	72°C (1min)
Elongation finale	72°C (5min)	72°C (5min)
Cycle	40	35

Annexe7 : Liste des patients prélevés.

Numéro	Sexe	Age (ans)	Service	Type de prélèvement
01	H	42	Stomatologie	Salive
02	H	39	Stomatologie	Salive
03	F	43	Stomatologie	Salive
04	F	20	Stomatologie	Salive
05	F	24	Stomatologie	Salive
06	H	36	Stomatologie	Salive
07	H	28	Stomatologie	Salive
08	F	70	Stomatologie	Salive
09	H	35	parasitologie- mycologie	Salive
10	H	02	parasitologie- mycologie	Salive

Annexes

11	H	29	parasitologie- mycologie	Salive
12	F	32	maladies infectieuses	Salive
13	F	13 mois	maladies infectieuses	Salive
14	H	06	maladies infectieuses	Salive
15	H	82	Stomatologie	Salive
16	H	31	parasitologie- mycologie	Salive
17	F	62	Stomatologie	Salive
18	F	34	parasitologie- mycologie	Salive
19	F	47	parasitologie- mycologie	Salive
20	F	61	Stomatologie	Salive
21	H	19	Stomatologie	Tartre
22	F	52	Stomatologie	Plaque dentaire
23	H	60	Stomatologie	Tartre
24	H	23	Stomatologie	Biofilm
25	H	37	Stomatologie	Plaque dentaire
26	F	28	Stomatologie	Plaque dentaire
27	H	27	parasitologie- mycologie	Salive
28	H	55	maladies infectieuses	Salive
29	H	44	maladies infectieuses	Salive
30	H	34	maladies infectieuses	Salive
31	F	48	maladies infectieuses	Salive
32	F	49	Stomatologie	Plaque dentaire
33	F	49	Stomatologie	Plaque dentaire
34	H	64	Stomatologie	Salive
35	H	69	Stomatologie	Tartre
36	H	70	maladies infectieuses	Salive
37	H	40	maladies infectieuses	Salive
38	H	27	maladies infectieuses	Salive
39	H	28	maladies infectieuses	Salive
40	H	39	maladies infectieuses	Salive

41	H	73	maladies infectieuses	Salive
42	F	39	maladies infectieuses	Salive
43	H	53	maladies infectieuses	Salive
44	H	37	maladies infectieuses	Salive
45	H	37	maladies infectieuses	Salive
46	H	32	Stomatologie	Biofilm
47	F	21	Stomatologie	Biofilm
48	H	49	maladies infectieuses	Salive
49	F	44	Stomatologie	Tartre
50	H	40	Stomatologie	Tartre
51	H	30	Stomatologie	Plaque dentaire
52	F	32	Stomatologie	Plaque dentaire
53	H	29	Stomatologie	Plaque dentaire
54	F	34	Stomatologie	Tartre
55	F	65	Stomatologie	Tartre
56	F	32	maladies infectieuses	Salive
57	H	30	maladies infectieuses	Salive
58	F	35	maladies infectieuses	Salive
59	H	34	maladies infectieuses	Salive
60	H	53	maladies infectieuses	Salive
61	H	37	maladies infectieuses	Salive
62	H	31	maladies infectieuses	Salive
63	F	29	parasitologie-mycologie	Salive
64	H	27	parasitologie-mycologie	Salive
65	H	63	maladies infectieuses	Salive
66	H	44	maladies infectieuses	Salive
67	H	38	maladies infectieuses	Salive
68	H	28	maladies infectieuses	Salive
69	H	33	maladies infectieuses	Salive

Annexes

70	F	42	maladies infectieuses	Salive
71	F	44	maladies infectieuses	Salive
72	H	40	maladies infectieuses	Salive
73	H	28	maladies infectieuses	Salive
74	F	47	maladies infectieuses	Salive
75	F	43	stomatologie	Tartre
76	H	70	parasitologie-mycologie	Salive

Annexe 8 : Liste des sucres testés par Auxacolor™2

AUXACOLOR™ 2

REF

	C.Neg	GLU. MAL. SAC.	GAL. LAC. RAF.	INO. CEL. TRE.	ADO. MEL. XYL.	ARA. HEX. POX./PRO.	PI. AR. CA.	MY. PS-MY.	CHL.
24 h	○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○ ○			
48 h	○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○ ○	+	+	+
72 h	○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○ ○	-	-	-

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 ⊕/⊖ 1 2 4 1 2 4

Identification / Identificación / Identifizierung :
 Identificazione / Identificação / Identifikation :

BIO-RAD

Références

Bibliographiques

AL-SAEED, W.M. Pathogenic effect of *Entamoeba gingivalis* on gingival tissue of rats. Al-Rafidain Dental Journal.2003 ; 3 (1), 70-3.

BADO F, FLEURIDAS G, LOCKHART R, CHIKHANI L, FAVRE-DAUVERGNE E, BERTRAND JC, GUILBERT F. Cellulites cervicales diffuses à propos de 15 cas. Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale.1997 ; 98 : 266-8. Niveau 4.

BERCEY, TENEMBAUM. Parodontologie de diagnostic à la pratique. Bruxelles : De Boeck Supérieur, 1996, p 50- 97-98-107-108-128-195 -197-199-200.

BERGQUIST, R. "Parasitic infections affecting the oral cavity." Periodontol 2000. 2009, **49**: 96-105.

BHAIJEE F, BELL D. *Entamoeba gingivalis* in Acute Osteomyelitis of the Mandible. *Case Reports in Medicine*. 2011; 2011:1–3.

BISSON-BOUTELLIEZ, C. Desulfovibrio spp. Dans la maladie parodontale : Interactions avec les cellules épithéliales KB et activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur ses formes extracellulaires et intracellulaires. Thèse pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-1Mention Pharmacologie, U.F.R. D'ODONTOLOGIE Ecole doctorale Biologie, Santé et Environnement (BioSE) : Université Henri Poincaré, Nancy-1, 2009, p 19-20-21.

BONNER M., Tant de bouches à guérir... des parasites qui les vampirisent. Vaincre la parodontite. Éditions Amyris, 2009 ; ISBN 978-2-9303-5375-3.

BONNER, M., AMARD, V., BAR-PINATEL, C., CHARPENTIER, F., CHATARD, J.-M., DESMUYCK, Y., IHLER, S., ROCHET, J.-P., ROUX DE LA TRIBOUILLE, V., SALADIN, L., VERDY, M., GIRONES, N., FRESNO, M. ET SANTI-ROCCA, J. Detection of the amoeba *Entamoeba gingivalis* in periodontal pockets. 2014, 21, 30. DOI:10.1051/parasite/2014029 PMID : 24983705 PMC 4077299.

BONNER M., *Tant de bouches à guérir... des parasites qui les vampirisent. Vaincre la parodontite.* Éditions Amyris, 2009, ISBN 978-2-9303-5375-3.

CEMRANELLI, SBS., SOUTO, FO., FERREIRA-PAIM, k., RICHINHO, TT., NUNES, PL., et al; First Evidence of Genetic Intraspecific Variability and Occurrence of *Entamoeba gingivalis* in HIV (+)/AIDS. 2013, PLoS ONE 8(12): e82864. doi:10.1371/journal.pone.0082864.

Références

Bibliographiques

CHARON, J., MOUTON, C. La parodontie médicale .1ere édition CDP, 2003, p 38-39-40-41-42- 43-211-212-213-214-215-216-217-218-235-236.

CHARDIN, H., BARSOTTI, O., BONNAURE-MALLET, M. Microbiologie en odontostomatologie. France: Maloine, 2006, p 141-144-269-270-271-274-305-308-311-312.

CHEN, J., LIU, G., WEN, W. Studies on the continuous culture and the growth of *Entamoeba gingivalis*. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases. 1999, 14 (4), 209-11.

CHEN, J. F., LIU, G.Y., WEN, W. R., CHEN, C. Studies on the continuous culture and pathogenicity of *Entamoeba gingivalis*. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases. 2000, 18 (2), 84-6

CLAYTON, J.P., BALL, G.H. Effects of penicillin on *Entamoeba gingivalis* in with cultures bacteria from the human mouth. Journal of Parasitology. 1954, 40 (3), 347-52.

CUEVAS, R.F., RAMOS, A.S.B., CONTRERAS, C.C., HERNÁNDEZ-SIERRA, F. Prevalencia y asociación epidemiológica de los protozoarios orales *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax* en niños mexicanos. Revista ADM LXV. 2006, (5), 259-62.

DOBELL, C. The amoebae living in man. The Journal of Parasitology.1920, 6 (4), 83-91.

DOWD SE, SUN Y, SECOR PR, et al. Survey of bacterial diversity in chronic wound using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. BMC Microbiol.2008; 8(1):43.

EI HAYAWAN, I.A., BAYOUMY, M.M. The prevalence of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in periodontal disease. Journal Egypty of Society Parasitology. 1992, 22 101-05.

FAVORETO JUNIOR S, MACHADO MI. Incidence, morphology and diagnostic studies of *Entamoeba gingivalis*, Gros, 1849. 1995, Rev Soc Bras Med Trop 28: 379–387

FEKI A, MOLET A. Importance des protozoaires *Trichomonas tenax* et *Entamoeba gingivalis* dans la cavité buccale humaine. R OdontoStomatol. 1990, tome 19, N°1.

GANNON, J. T., LINKE, H. A. B. Growth studies on xenic cultures of *Entamoeba gingivalis* using established media. International Journal Parasitology. 1989, 19 (8), 835-38.

Références

Bibliographiques

GANNON, J.T., LINKE, H.A.B. Studies on the microflora associated with xenic cultures of *Entamoeba gingivalis*. **Microbios**. 1989, 58 95-100.

GANNON, J.T., LINKE, H.A.B. A new medium containing antibiotics for the xenic cultivation of *Entamoeba gingivalis*. **Parasitology Research**. 1990, 76 643-47.

GHABANCHI, J., ZIBAEI, M., DAGHIGH AFKAR, M., SARBAZIE, A.H. Prevalence of oral *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in patients with periodontal disease and healthy population in Shiraz, southern Iran. Original Research. 2010, 21 (1), 89-91.

GHARAVI MJ, HEKMAT S, EBRAHIMI A, JAHANI MR. Buccal cavity protozoa in patients referred to the faculty of dentistry in Tehran, Iran. Iranian Journal of Parasitology. 2006; 1(1):43–6.

GOTTLIEB, D.S., MILLER, S., EBRAHIMI, A., JAHANI, M.R. Buccal cavity protozoa in patients referred to the faculty of dentistry in Tehran, Iran. Iranian Journal Parasitology. 2006, 1(1): 43-46.

GOTTLIEB, D.S., MILLER, L.H. *Entamoeba gingivalis* in periodontal disease. Journal of Periodontics. 1971.42 (7), 412-15.

GROS G. 1849. Fragments d'helminthologie et de physiologie microscopique. Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou, 22, 549-573.

HALL-STOODLEY L, STOODLEY P. Evolving concepts in biofilm infections. Cell Microbiol. 2009, 11(7): 1034-43.

HERNÁNDEZ, L.A.R., RAMOS, E.B.J., RODRÍGUEZ, A.C. Identificación morfológica de bacterias observadas en 10 casos de periodontitis crónica agresiva (PCA) en presencia de *Entamoeba gingivalis*.

HUANG, W., SHI, JIAN-LING., LI, CHUN-LEI., CHEN B., SHAO LI-JIA., CHEN, LI., HAO, F., DING, LEI, TIAN, XI-FENG. *Entamoeba gingivalis* infection among college students in Tangshan. Chinese Journal Parasitology Disease. 2009, 27 (1), 51-3.

JASKOSKI, B.J. Incidence of oral protozoa. Transactions of the American Microscopical Society. 1963, 82 (4), 418-20.

JIAN, B., KOLANSKY, A.S., BALOACH, Z. W., GUPTA, P. K. *Entamoeba gingivalis* pulmonary abscess- diagnosed by fine needle aspiration. Cyto Journal. 2008, 5 (12), 1-3.

Références

Bibliographiques

JUNIOR, S.F., MACHADO, M.I. Estudos de frequência, morfologia e diagnóstico de *Entamoeba gingivalis*, Gros, 1849. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1995, 28 (4), 379-87.

KELLER, O., ORLAND, F.J., BAIRD, G. Ultrastructure of *Entamoeba gingivalis*. Journal Dental Research. 1967, 46 (5), 1010-18.

KIKUTA, N., YAMAMOTO, A., GOTO, N. Detection and identification of *Entamoeba gingivalis* by specific amplication of rRNA gene. Canadian Journal Microbiology. 1996, 42 1248-51.

KIKUTA, N., YAMAMOTO, A., FUKURA, K., GOTO, N. Specific and sensitive detection of *Trichomonas tenax* by the polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology 1996, 24, 193-197.

KOFOID CA, HINSHAW HC, JOHNSOTNE HG. « Animal parasites of the mouth and their relation to dental disease » *Journal of the American Dental Association* 1929, 1434-1455.

KOFOID, C.A. The protozoa of the human month. *Journal of Parasitology*. 1929, 15, 151-74.

KUFFER, R., LOMBARDI, T., HUSSON-BUI, C., COURRIER, B., SAMSON, J. La muqueuse buccale de la clinique au traitement. Paris: MED'COM, 2009, p 13-18.

LYONS T. et al. « Oral amoebiasis: a new approach for the general practitioner in the diagnosis and the treatment of periodontal disease » *Oral Health* 1980; 70:39-41, 108, 110.

LYONS T. Introduction to protozoa and fungi in periodontal infections. Trevor Lyons Publications, Ontario, Canada 1989. ISBN 0-9693950-0-0.

NOCITO-MENDOZA, I., VASCONI-CORREAS, M.D., PONCE de LEÓNHORIANSKI, ZDERO-PANDZICH, M. *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax* en pacientes diabéticos. 2003, RCOE 8 (1), 27-38.

OUHAYOUN, J-P. Le traitement parodontal en omnipratique. Quintessence international, 2012, p 38-77-122

PEREZ-JAFFE, L., KATZ, R., GUPTA, P. K. *Entamoeba gingivalis* identified in a left upper neck nodule by fine-needle aspiration: a case report. *Diagnostic Cytopathology*. 1997, 18 (6), 458-61.

Références

Bibliographiques

ROUVIERE H. Anatomie humaine : descriptive, topographique et fonctionnelle. In : Delmas A éd. Paris : Masson 1974 : 446-453.

SANTOS, F.S. Efeito amebicida de uma solução hidroalcoólica de própolis sobre a *Entamoeba gingivalis* presente na cavidade orla humana. Dissertação de mestrado, Universidade de Franca 2001.

SEVERINE VINCENT (AHU à la faculté d'Odontologie de Nice), Yves Charbit (MCU faculté d'Odontologie de Nice), Pierre Marty (PU, Parasitologie, Faculté de Médecine de Nice) LES PARASITES ET MALADIES PARODONTALES.2011, France.

SLOTS J. Microflora in the healthy gingival sulcus in man.Scand J Dent Res. 1977, 85 (4): 257-54.

SMITH, A.J., BARRET, M.T. The parasite of oral endamebiasis *Endameba gingivalis* (Gros). 1915, The Journal of Parasitology 1 (4).

SOSA, L.M., GONZÁLEZ, M., NARANJO, B., NAVAS, I., QUINTANA, B. Levantamiento epidemiológico bucal en escolares de 1° y 2° etapa. Síntesis: Tesis de grado presentado en hospital Victorino Santaella Ruíz 2003.

TRIM RD, SKINNER MA, FARONE MB, DUBOIS JD, AND NEWSOME AL. Use of PCR to detect *Entamoeba gingivalis* in diseased gingival pockets and demonstrate its absence in healthy gingival sites. 2011, Parasitol Res 109: 857–864.

VRABLIC, J., TOMOVA, S., CATAR, G., RANDOVA, L., SUTTOVA, S. Morfology and diagnosis of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* and their occurrence in children and adolescents. 1991; Bratisl Lek Listy 92 241-46.

WANTLAND, W.W., WANTLAND E. M., REMO, J.W., WINQUIST, D. L. Studies of human mouth protozoa. 1958; Journal Dental Research 37 (5), 949-0.

WANTLAND, W.W., WANTLAND. E.M., REMO, J.W. Cytology and morphogenesis of *Entamoeba gingivalis*. 1960; Journal Dental Research 40 (624), 624-624.

WANTLAND, W.W., WANTLAND, E.M., WINQUIST, D.L. Collection, Identification, and cultivation of oral protozoa. 1963, Journal Dental Research 42 (5), 1231-41.

WANTLAND, W.W., LAUER, D. Correlation of some oral hygiene variables with age, sex and incidence of oral protozoa. 1968; Journal Dental Research 49 (2), 293-97.

Références

Bibliographiques

Wantland WW, Lauer D. Correlation of some oral hygiene variables with age, sex, and incidence of oral protozoa. 1970; J Dent Res 49: 293–297.

ZUNZARREN, R. Guide clinique d'odontologie. Bordeaux : ELSEVIER Masson, 2011, p 102-119.