Faculté d'Odontologie
Aix*Marseille Université

THESE

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

Présentée et publiquement soutenue devant la

Faculté d'Odontologie de Marseille
(Doyen : Monsieur le Professeur Bruno FOTI)

Aix Marseille Université
(Président : Madame le Professeur Simone BONNAFOUS)
Administratrice provisoire

Archaea méthanogènes et protozoaires de la cavité buccale : étude préliminaire

Présentée par :

DELENNE Stéphane

Né(e) le 22 mai 1991

A Bastia

Thèse soutenue le **Jeudi 03 octobre 2019**

Devant le jury composé de :

Président : **Professeur RUQUET Michel**

Assesseurs : **Docteur ABOUDHARAM Gérard**

Docteur LAURENT Michel

Docteur MENSE Chloé

Faculté d'Odontologie
Aix*Marseille Université

THESE

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

Présentée et publiquement soutenue devant la

Faculté d'Odontologie de Marseille
(Doyen : Monsieur le Professeur Bruno FOTI)

Aix Marseille Université
(Président : Madame le Professeur Simone BONNAFOUS)
Administratrice provisoire

Archaea méthanogènes et protozoaires de la cavité buccale : étude préliminaire

Présentée par :

DELENNE Stéphane

Né(e) le 22 mai 1991

A Bastia

Thèse soutenue le **Jeudi 03 octobre 2019**

Devant le jury composé de :

Président : **Professeur RUQUET Michel**

Assesseurs : **Docteur ABOUDHARAM Gérard**

Docteur LAURENT Michel

Docteur MENSE Chloé

ADMINISTRATION

Mise à jour : octobre 2019

DOYENS HONORAIRES	PROFESSEUR	RAYMOND SANGIUOLO†
	PROFESSEUR	HENRY ZATTARA
	PROFESSEUR	ANDRE SALVADORI
	PROFESSEUR	JACQUES DEJOU
DOYEN	PROFESSEUR	BRUNO FOTI
ASSESSEURS	PROFESSEUR	MICHEL RUQUET
	PROFESSEUR	ANNE RASKIN
DIRECTEURS DE DEPARTEMENTS		
FORMATION INITIALE	PROFESSEUR	MICHEL RUQUET
RECHERCHE	PROFESSEUR	ANNE RASKIN
FORMATION CONTINUE	PROFESSEUR	FREDERIC BUKIET
CHARGES DE MISSIONS		
RELATIONS INTERNATIONALES	PROFESSEUR	HERVE TASSERY
INTERNAT ET DIPLOMES D'ETUDES SPECIALISEES	PROFESSEUR	VIRGINIE MONNET-CORTI
AFFAIRES GENERALES	DOCTEUR	PATRICK TAVITIAN
RESPONSABLE DES SERVICES ADMINISTRATIFS ET TECHNIQUES	MADAME	KATIA LEONI

LISTE DES ENSEIGNANTS

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES CSERD

BUKIET FREDERIC (58-01)
DEJOU JACQUES (58-01)
FOTI BRUNO (56-02)
MONNET-CORTI VIRGINIE (57-01)
ORTHLIEB JEAN-DANIEL (58-01)
RASKIN ANNE (58-01)
RUQUET MICHEL (58-01)
TARDIEU CORINNE (56-01)
TARDIVO DELPHINE (56-02)
TASSERY HERVE (58-01)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

ABOUT Imad (65)

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES CSERD

ABOUDHARAM GERARD (58-01)
BANDON DANIEL (56-01)
BELLONI DIDIER (57-01)
BOHAR JACQUES (56-01)
CAMOIN ARIANE (56-01)
CAMPANA FABRICE (57-01)
CATHERINE JEAN-HUGUES (57-01)
ERARD-MAGNO ELISABETH (56-01)
GAUBERT JACQUES (56-01)
GIRAUD THOMAS (58-01)
GIRAUDEAU ANNE (58-01)
GUIVARC'H MAUD (58-01)
JACQUOT BRUNO (58-01)
LABORDE GILLES (58-01)
LAN ROMAIN (57-01)
LAURENT MICHEL (58-01)
LAURENT PATRICK (57-01)
LE GALL MICHEL (56-01)
MAILLE GERALD (58-01)
PHILIP-ALLIEZ CAMILLE (56-01)
PIGNOLY CHRISTIAN (58-01)
POMMEL LUDOVIC (58-01)
PRECKEL BERNARD-ÉRIC (58-01)
RÉ JEAN-PHILIPPE (58-01)
ROCHE-POGGI PHILIPPE (57-01)
STEPHAN GREGORY (58-01)
TAVITIAN PATRICK (58-01)
TERRER ELODIE (58-01)
TOSELLO ALAIN (58-01)

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

BLANCHET ISABELLE (56-01)
MENSE CHLOE (58-01)

ASSISTANTS HOSPITALIERS ET UNIVERSITAIRES

AL AZAWI HALA (56-01)
BACHET-DORISON DAMIENNE (56-01)
BALLESTER BENOIT (58-01)
BARBERO MAGALI (56-01)
BOYER ALEXANDRA (57-01)
CAMBON ISABELLE (56-01)
CASAZZA ESTELLE (56-01)
CASTRO ROMAIN (57-01)
DAVID LAURA (56-01)
DEVICTOR ALIX (58-01)
DODDS MELINA (58-01)
DRAUSSIN THIERRY (56-02)
DUMAS CATHY (57-01)
HADJ-SAID MEDHI (57-01)
HAHN-GOLETTI LARISSA (58-01)
JEANY MARION (58-01)
LEVY LAURA (56-01)
LIOTARD ALICA (58-01)
MANSUY CHARLOTTE (58-01)
MARTIN WILLIAM (56-01)
MATTERA REMI (56-01)
MELLOUL SEBASTIEN (57-01)
PARFU ANNE (58-01)
PILLIOL VIRGINIE (58-01)
REPETTO ANDREA (58-01)
ROMANET YVAN (57-01)
SANTUNIONE CHARLOTTE (58-01)
SILVESTRI FREDERIC (58-01)
VINAÏ MICHAEL (56-01)

ASSISTANT ASSOCIE DES UNIVERSITES

LE FOURNIS CHLOE (57-01)
THOLOZAN LEA (57-01)

Intitulés des sections CNU :

- *56ème section : Développement, croissance et prévention*
  - *56-01 Odontologie pédiatrique et orthopédie dento-faciale*
  - *56-02 : Prévention – Epidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale*
- *57ème section : Chirurgie orale ; Parodontologie ; Biologie Orale*
  - *57-01 : Chirurgie orale – Parodontologie – Biologie orale*
- *58ème section : Réhabilitation orale*
  - *58-01 : Dentisterie restauratrice – Endodontie – Prothèses – Fonction-Dysfonction – Imagerie – Biomatériaux*

L'auteur s'engage à respecter les droits des tiers, et notamment les droits de propriété intellectuelle. Dans l'hypothèse où la thèse comporterait des éléments protégés par un droit quelconque, l'auteur doit solliciter les autorisations nécessaires à leur utilisation, leur reproduction et leur représentation auprès du ou des titulaires des droits. L'auteur est responsable du contenu de sa thèse. Il garantit l'Université contre tout recours. Elle ne pourra en aucun cas être tenue responsable de l'atteinte aux droits d'un tiers

Remerciements

A mon Président de thèse

Monsieur le Professeur M.RUQUET

Professeur des Universités

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, ainsi que pour la qualité de votre enseignement, votre gentillesse et votre disponibilité.
Veuillez trouver l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A mon Directeur de thèse

Monsieur le Docteur G.ABOUDHARAM

Maître de conférences des Universités

Je vous remercie de m'avoir accompagné et soutenu tout au long de ce travail. Je vous remercie également pour tous les précieux conseils que m'avez prodigués lors des stages passés au sein de votre cabinet, qui m'ont permis de progresser tant au niveau clinique que dans ma relation avec les patients. Soyez assuré de ma considération et de mon plus profond respect.

A mon Juge

Monsieur le Docteur M.LAURENT

Maître de conférences des Universités

Vous m'avez fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse et je vous en remercie. Vos conseils pertinents, votre disponibilité et le plaisir que j'ai eu à travailler à vos côtés à la clinique m'ont permis de progresser, pour cela je tenais à vous exprimer ma plus profonde gratitude.

A ma Juge

Madame le Docteur C.MENSE

Maître de conférences des Universités

Je tenais à vous remercier d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. J'aurais aimé pouvoir travailler davantage avec vous afin de bénéficier de vos qualités d'enseignements, malgré cela je ne saurais que reconnaitre votre bienveillance et gentillesse à mon égard.
Je vous prie d'accepter mes sentiments les plus sincères.

Sommaire

I Introduction _____ **1**
I.1 La parodontite _____ **1**
I.2 *Trichomonas tenax* _____ **7**
I.3 Les archaea méthanogènes _____ **9**
II Matériel et méthode _____ **13**
II.1 Les données médicales _____ **13**
II.2 Les prélèvements _____ **14**
II.3 Extraction de l'ADN _____ **18**
II.4 Biologie moléculaire _____ **19**
II.5 Hybridation in situ par fluorescence (FISH) _____ **20**
III Résultats _____ **21**
III.1 Les prélèvements _____ **21**
III.2 Recherche de protozoaire à l'état frais _____ **21**
III.3 Mise en culture des prélèvements _____ **21**
III.4 Détection moléculaire d'archaea méthanogènes _____ **21**
III.5 Hybridation in situ par fluorescence (FISH) _____ **22**
IV Discussion _____ **24**
V Annexes _____ **1**
VI Bibliographie _____ **1**

I INTRODUCTION

I.1 La parodontite

La parodontite est une maladie inflammatoire d'origine infectieuse. Elle affecte les tissus qui soutiennent les dents. L'ensemble de ces tissus est nommé « parodonte ». Ces tissus comprennent la gencive, le desmodonte, le cément et l'os alvéolaire. (**Figure 1**)

Elle débute généralement par une gingivite qui est une inflammation de la gencive, puis s'étend progressivement vers le tissu osseux en formant des « poches parodontales » caractérisées par une perte d'attache. Une gingivite est réversible. En général, il ne reste pas de séquelle après traitement de la gingivite et mise en place de nouvelles habitudes de nettoyage. A l'inverse les pertes de substance osseuse provoquées par la parodontite aboutiront à un déficit permanent, qui pourra être corrigé ou non par un traitement chirurgical en fonction des différentes situations cliniques.

En l'absence de traitement, les parodontites peuvent être responsables de la destruction des tissus de soutien de la dent, entraînant des mobilités accrues, des migrations dentaires, ou, pourront aller jusqu'à la perte spontanée de la dent. Ces conséquences diminueront la capacité masticatoire et joueront un rôle négatif dans la fonction et l'esthétique global du patient.

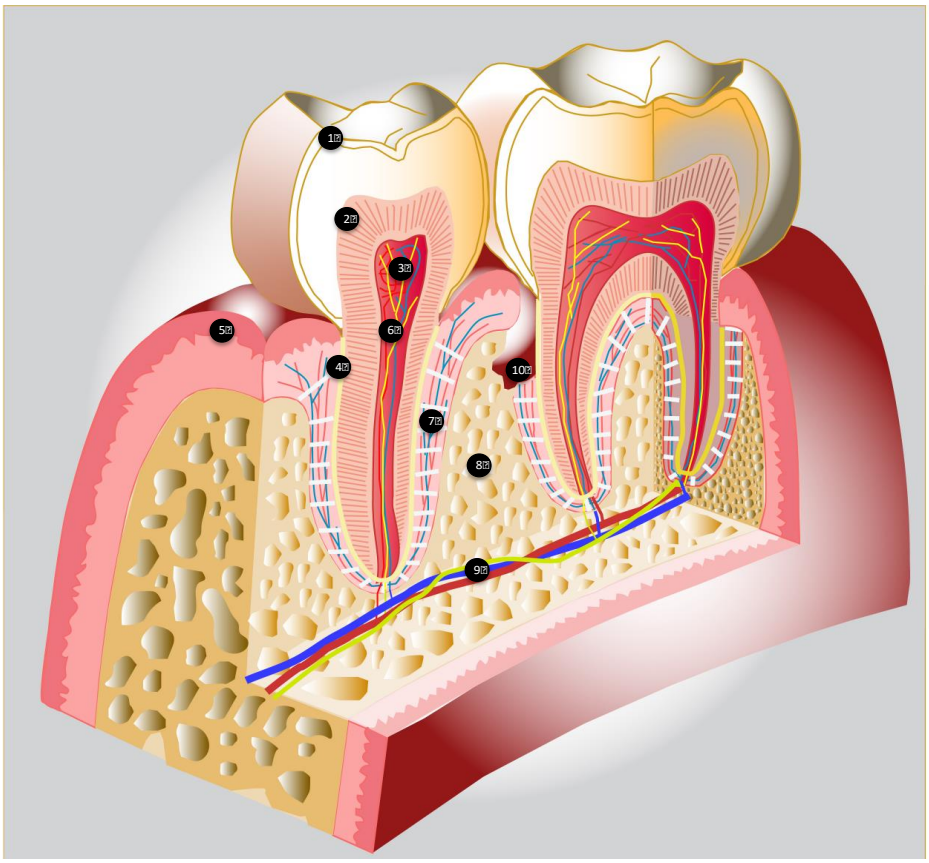


Figure 1 : Coupe Longitudinale d'une prémolaire et d'une molaire mandibulaire avec les différentes structures anatomiques
(1) Email, (2) Dentine, (3) Pulpe dentaire, (4) Cement, (5) Gencive kératinisée, (6) Vaisseaux sanguins et nerf, vascularisation terminale, (7) Ligament parodontal (8) Os alvéolaire, (9) nerfs et vaisseaux sanguins supplémentaires (10) Poche parodontale avec tartre.

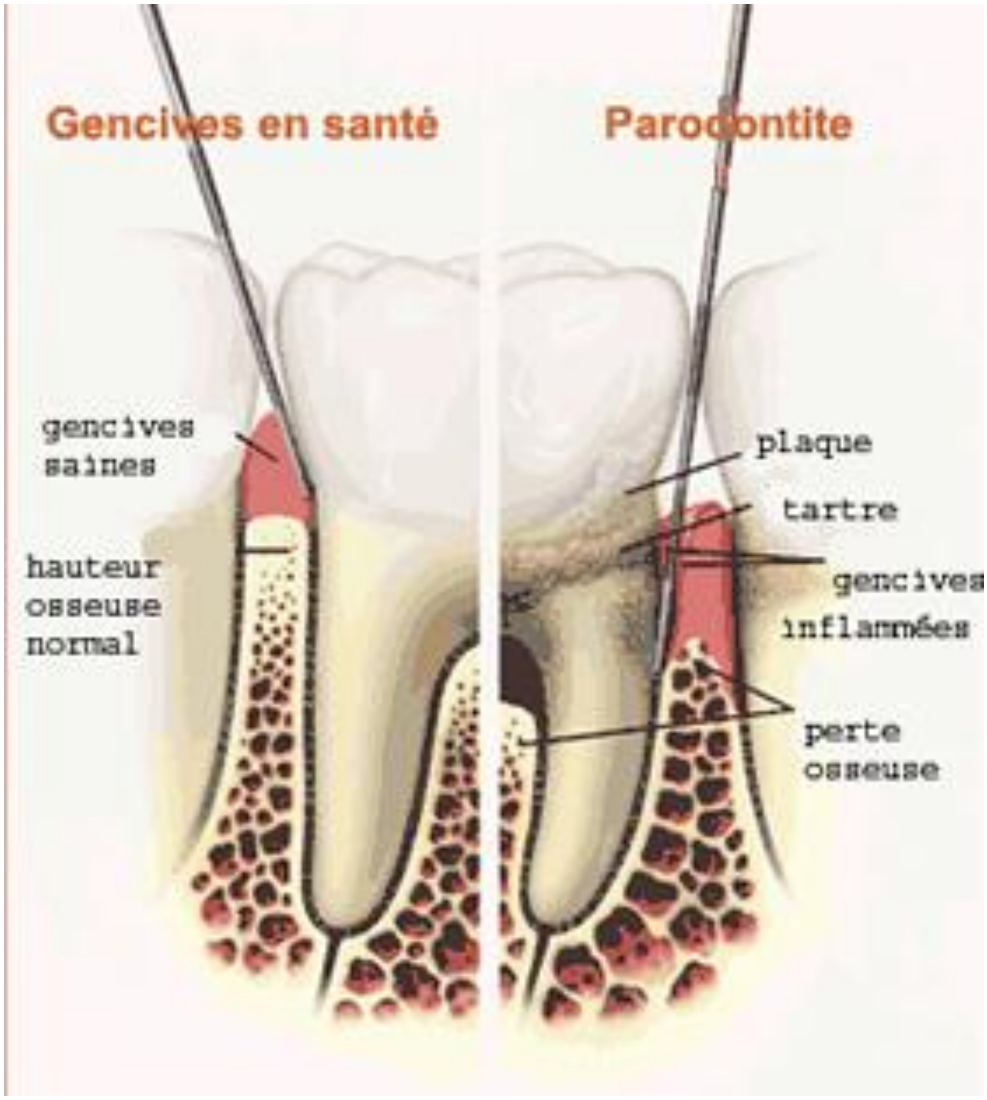


Figure 2 : Gencive saine / parodontite

D'autres symptômes et signes cliniques peuvent être observés ou non comme la présence d'une inflammation, des saignements gingivaux spontanés ou provoqués, la présence d'abcès parodontaux, de récessions gingivales ou un phénomène d'halitose (1).

Il existe plusieurs formes de parodontites et leur classification a longtemps été débattue. Les spécialistes parlent préférentiellement de «maladies parodontales», qui regroupent toutes les atteintes du parodonte.

En accord avec les recommandations de l'ANAES, on utilisera la classification de l'Académie Américaine de Parodontologie.(2)
Elle propose de répartir ces maladies en 8 groupes principaux :
- Maladies gingivales
- Parodontites chroniques
- Parodontites agressives
- Parodontite manifestation d'une maladie systémique
- Parodontites ulcéro-nécrotiques
- Abcès parodontal
- Parodontite associée à une pathologie endodontique
- Anomalies bucco-dentaires acquises ou congénitales en rapport avec des maladies parodontales

Une nouvelle classification a été publiée en 2018. Elle est le fruit d'un consensus entre l'académie américaine de parodontologie et la fédération européenne de parodontologie. Elle n'a pas été utilisée pour cette étude car publiée après le début cette recherche (3).

A l'inverse d'une gingivite, les conséquences d'une parodontite sont la plupart du temps irréversibles. On pourra observer la présence de séquelles même si celles-ci sont stabilisées à la suite de la mise en place des traitements, en particulier la perte osseuse. Les maladies parodontales sont la première cause de perte de dents chez l'adulte. Elles constituent un problème de santé publique majeur.

Les surfaces humides et tièdes de notre bouche (33,2 à 38,2 °) (4) représentent un habitat idéal pour les microorganismes et principalement pour les bactéries, les levures et les protozoaires.

Ces micro-organismes bénéficient aussi d'un apport énergétique grâce à notre alimentation (hydrates de carbone) réguliers. La survie des bactéries repose sur leur capacité à adhérer à un support, muqueux ou dentaire, qui les préserve de l'élimination par le flux salivaire.

Quelques espèces bactériennes, comme les streptocoques, peuvent se fixer directement sur la pellicule exogène acquise. Ce phénomène tient d'une part aux ions calcium chargés positivement qui interviennent entre les surfaces chargées négativement de la pellicule et les bactéries et d'autre part, à la liaison spécifique des protéines bactériennes (lectines) à la structure de la pellicule.

Dans les minutes qui suivent le brossage des dents, les premières bactéries recommencent à adhérer à la pellicule exogène acquise et prolifèrent par division cellulaire pour former un biofilm (5).

Cette première couche de bactéries « pionnières » favorise l'adhérence ultérieure des autres. Après deux à trois heures une plaque visible à l'œil nu s'est formée. Dans les zones protégées de la bouche, les colonies bactériennes forment dans les jours qui suivent des structures tridimensionnelles épaisses et complexes qui donneront la plaque. Sans brossage ou passage du fil dentaire entre les dents la plaque peut s'épaissir jusqu'à un millimètre d'épaisseur et représenter plusieurs centaines de colonies. Dans ces colonies, et plus particulièrement dans les couches inférieures à la base des dents, il se produit un manque d'oxygène. Pour continuer d'extraire l'énergie des aliments, les bactéries doivent passer à l'étape de fermentation qui génère des acides organiques à la place du dioxyde de carbone et de l'eau. Le microclimat acide obtenu dissout le cristal d'hydroxyapatite et favorise la formation de caries. Après une semaine, la plaque commence à se minéraliser : le calcium et le phosphate de la salive se déposent dans les colonies bactériennes et les durcissent, entraînant la formation de tartre.

La prolifération de ce biofilm et du tartre est un facteur éthio-pathologique majeur de la parodontite. Il existe des facteurs de risques aggravant comme le tabac et le diabète, ou des facteurs locaux comme les malpositions dentaires.

Socransky a regroupé en complexes ces bactéries retrouvées dans le biofilm (**Figure 3**). Son équipe a démontré qu'il existe des associations de microorganismes provocant des dégradations plus ou moins importantes du parodonte, à l'image des bactéries du complexe rouge (*Porphynomonas gingivalis, Tanneralla forsythia et Treponema denticola*) qui sont des bactéries gram négatives capables de coloniser l'espace sous gingival, ayant le pouvoir de détruire les tissus parodontaux en promouvant une réponse immuno-destructive de l'hôte.(6)

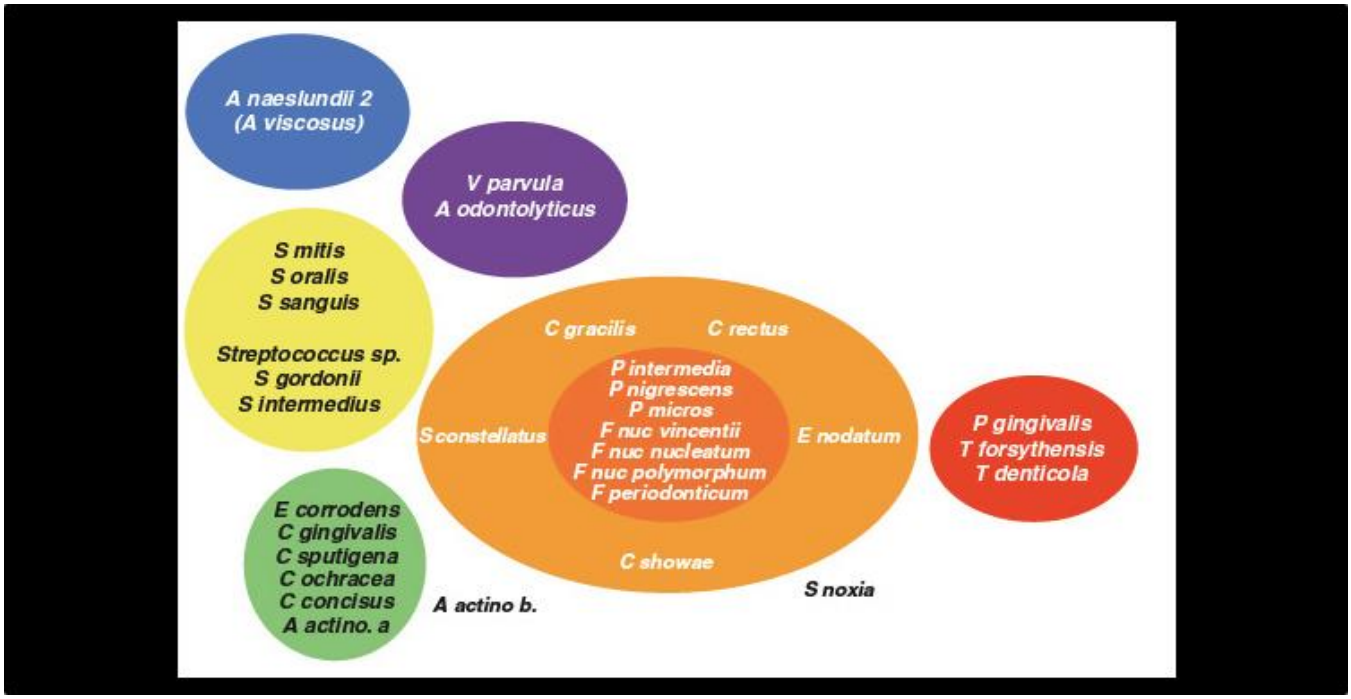


Figure 3 : schéma des différents complexes décrits par Socransky (5)

L'implication des autres microorganismes de la cavité buccale dans la maladie parodontale reste à ce jour controversée. C'est le cas pour les protozoaires unicellulaires *Tricomonas tenax* et *Entamoeba gingivalis*.

I.2 Trichomonas tenax

Un protiste est un microorganisme eucaryote à organisation cellulaire dite simple, le plus souvent unicellulaire, parfois pluricellulaire mais sans tissu spécialisé. Parmi ces protistes, on retrouve *Trichomonas tenax* qui est présent dans la cavité buccale de l'homme (7).

Les trichomonas sont des parasites communs à de nombreuses espèces de vertébrés et d'invertébrés. Quatre espèces sont classiquement considérées comme des parasites humains: *Dientamoeba fragilis*, *Pentatrichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis* et *Trichomonas tenax*. Les deux dernières espèces sont considérées comme spécifiques à l'homme. Par contre, *D. fragilis* et *P. homini* ont été aussi isolés chez des mammifères domestiques et d'élevage (8).

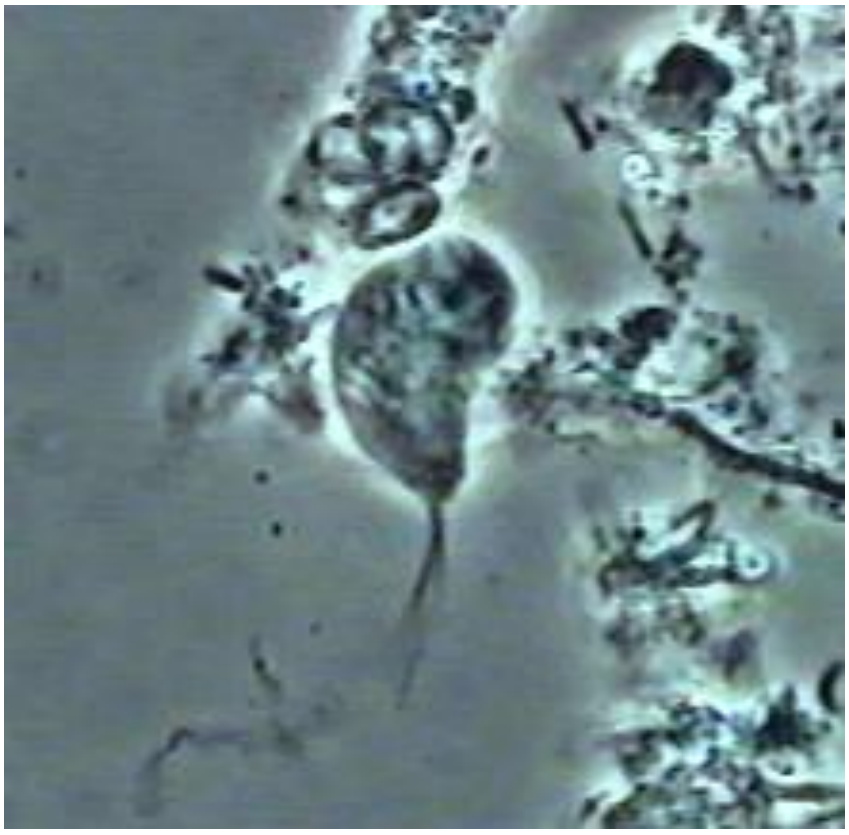


Figure 4 : *Trichomonas tenax* à l'état frais (source internet)

Les trichomonas sont des protistes flagellés et anaérobies appartenant aux groupes vastes et divers que sont les Trichomonadea et Tritrichomonadea du phylum Parabasalia. Ils se caractérisent par la présence de trois à cinq flagelles antérieurs, des hydrogénosomes qui sont des organites produisant de l'hydrogène correspondant à des versions anaérobies de la mitochondrie, un corps parabasal (un grand Golgi) et un cytosquelette complexe. Quelques espèces ont été isolées à partir d'échantillons environnementaux et peuvent représenter des espèces vivant librement. Cependant, la majorité des espèces forment des interactions symbiotiques avec divers hôtes animaux (9).

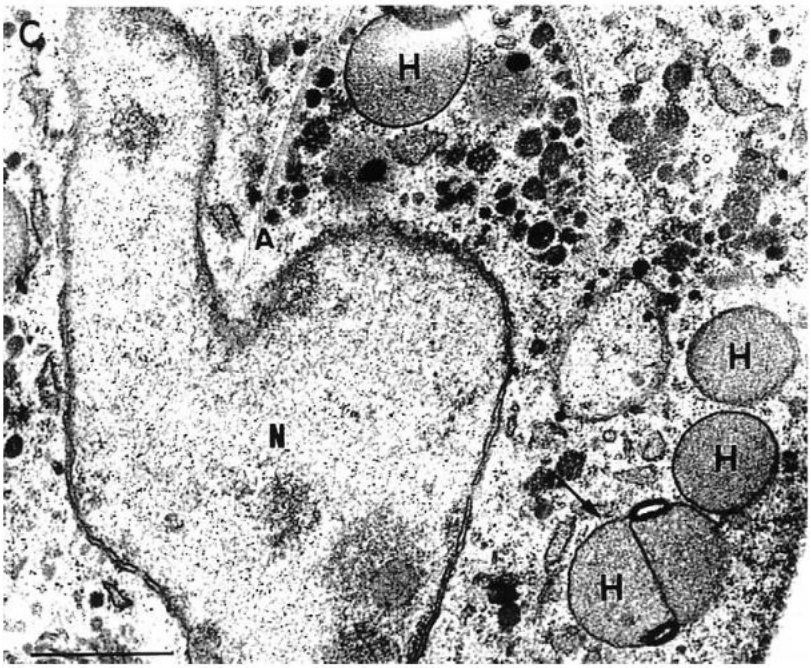


Figure 5 : hydrogénosome (H) vue en microscopie (10)

Tricomonas tenax est le plus petit des Trichomonas de l'homme, 6 à 8 microns de long sur 5 à 6 de large. Il possède un axostyle long et grêle, 4 flagelles antérieurs et un flagelle récurrent soulevant une membrane ondulante jusqu'aux deux tiers du corps.

I.3 Les archaea méthanogènes

Jusqu'au XXème siècle, la plupart des biologistes considéraient que tous les êtres vivants pouvaient être classés en deux domaines : plante ou animal. Mais dans les années 1950 et 1960, ils se sont rendus compte que ce système n'était pas adapté aux champignons, aux protistes et aux bactéries. Des travaux ont été réalisés par Carl Woese et George Fox à la fin des années 70 (11)

Ils ont révélé que le monde vivant n'était pas divisé en deux domaines (Procaryotes et Eucaryotes), mais en trois domaines. Le premier groupe de procaryotes, qu'ils baptisèrent Eubacteria (eu = vrai) regroupait la plupart des bactéries ainsi que celles extraites des mitochondries et des chloroplastes eucaryotes. Le deuxième groupe rassemblait quelques bactéries anaérobies strictes capables de produire du méthane comme déchet de leur métabolisme (méthanogénèse).

A cause de leur métabolisme singulier, supposé être très primitif sur la base de modèles de la composition de l'atmosphère terrestre ancienne (il y a 3-4 milliards d'années) et possiblement présent chez les premières formes de vie, Fox et Woese baptisèrent ce groupe Archaebacteria. Le dernier groupe était constitué des quatre règnes eucaryotes (plantes, animaux, champignons et protistes), qui possèdent des traits communs tels que les noyaux, les cytosquelettes ou encore les membranes internes. Les archaea sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, c'est à-dire des êtres vivants constitués d'une cellule unique qui ne comprend ni noyau ni organites, à l'instar des bactéries.

Ce groupe d'organismes était à l'origine considéré comme des bactéries extrêmophiles particulières (ce qui explique le nom initial de "archaebacteria"), en raison de leurs similitudes physiques jusqu'à ce que les recherches phylogénétiques sur les procaryotes aboutissent, avec les travaux de Carl Woese et George E. Fox, à la publication en 1977 d'un arbre phylogénétique fondé sur les séquences des gènes d'ARN ribosomique des organismes étudiés, arbre dans lequel les procaryotes étaient scindés en deux domaines distincts, celui des bactéries et celui des archaea. Quelques années plus tard, Woese proposa d'enlever le suffixe « bacteria » au mot archaebacteria, afin de souligner les

différences évolutives profondes séparant ces deux domaines, et les trois domaines devinrent : Archaea, Bacteria, et Eucarya. Du point de vue de leur génétique, leur biochimie et leur biologie moléculaire, les archaea sont des organismes aussi différents des bactéries que des eucaryotes. En effet, la structure lipidique de leur membrane est complètement différente de celle des autres organismes; les lipides membranaires des archaea consistent en de longues chaînes d'alcool isoprénoïques attachées au glycérol par des liaisons éther, alors que les autres organismes fabriquent les lipides de leurs membranes en assemblant deux chaînes d'acides gras avec une molécule de glycérol par l'intermédiaire d'une liaison ester. D'autre part, la transcription et la traduction chez les archaea sont plus proches de celles des eucaryotes que de celles des bactéries.

Les archaea méthanogènes utilisent le dioxyde de carbone ou d'autres composés organiques simples, et l'hydrogène, pour produire du méthane, un processus appelé méthanogenèse. Ce métabolisme, qui semble fait sur mesure pour l'atmosphère terrestre primitive, explique le choix initial fait par Carl Woese du terme archéobactérie. La méthanogenèse est en fait un mécanisme très complexe qui met en jeu des coenzymes spécifiques et qui n'existe que chez les archaea.

Les archaea méthanogènes prospèrent habituellement dans les environnements dans lesquels tous les autres accepteurs d'électrons (comme l'oxygène, les nitrates, les sulfates, et fer trivalent) ont été épuisés. On les retrouve dans tous les biotopes anaérobies. Il existe aussi des symbioses avec des bactéries anaérobies strictes qui fournissent en continu l'hydrogène et le gaz carbonique indispensables à la méthanogenèse hydrogénotrophe —> on dit qu'il se forme un consortium écologique.

Les archaea méthanogènes font partie de plusieurs microbiotes humains ; on les a retrouvés en effet dans les muqueuses intestinale, vaginale et orale. Ces organismes sont des procaryotes anaérobies stricts et leurs conditions de culture restent fastidieuses et très mal connues. Principalement trois archaea methanogènes ont été cultivés à partir de prélèvements humains, *Methanobrevibater smithii* et *Methanosphaera stadtmanae* à partir des selles puis *Methanobrevibater oralis* à partir de la plaque dentaire. Récemment l'ADN d'autres archaea méthanogènes et d'archaea non-méthanogènes a été détecté dans des selles humaines, y compris des séquences indiquant la présence d'espèces appartenant à un nouvel ordre de méthanogènes n'ayant aucun

représentant cultivé. La connaissance actuelle sur la diversité de ces méthanogènes chez l'homme et sur leurs effets potentiels sur la santé humaine est en grande partie basée sur les techniques de détection de l'ADN par PCR et la métagénomique. Ces techniques fondées sur la détection de l'ADN ribosomal 16S et du gène *mcr*A codant la sous-unité alpha du methylcoenzyme M reductase, une enzyme clé dans le processus de méthanogenèse, ont montré dans un premier temps que *M. smithii* était détecté chez moins de 50% des individus et *M. stadtmanae* chez 0-20 % seulement.

Les archaea méthanogènes ont été identifiés parmi la flore humaine du côlon, sous-gingivale et vaginale (**Figure 6**). Compte tenu de leur besoin d'un microenvironnement strictement anaérobie, les méthanogènes sont susceptibles d'exister dans les sites anatomiques humains où des bactéries anaérobies bien caractérisées peuvent s'épanouir, éventuellement sous forme de cohabitants.

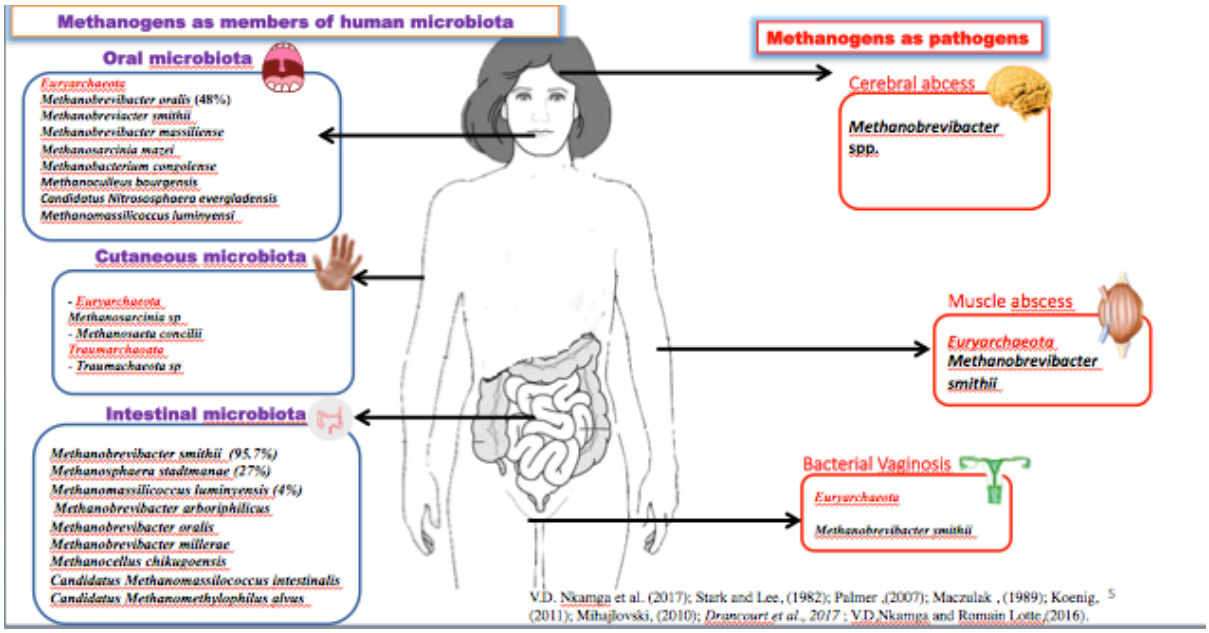


Figure 6 : Représentation schématique des archaea méthanogènes retrouvées chez l'homme

En plus des conditions anaérobies strictes requises pour la survie des méthanogènes dans le côlon humain, l'adaptation à l'environnement nutritif local spécifique doit avoir lieu si les méthanogènes entrent en compétition avec les autres membres de la microflore. La syntrophie entre les archaea et les bactéries réductrices de sulfates a été décrite à l'interface sulfate-méthane dans les fonds marins et dans les sédiments riches en méthane. La syntrophie est une situation

dans laquelle deux ou plusieurs organismes coopèrent à la consommation d'une substance (par exemple le méthane) qui ne peut être catabolisée par l'un ou l'autre seul. Il a été postulé que la syntrophie se produit dans la communauté microbienne anaérobie des poches parodontales profondes, où les méthanogènes consomment de l'H2 produit par les fermenteurs secondaires et contribuent aux maladies parodontales. Néanmoins des archaea ont été identifiées dans des prélèvements parodontaux de poches de malades présentant des parodontites légères et même chez des patients sains. Les conditions d'anaérobiose n'étant pas strictement réunies pour ces cas.

D'où l'idée d'une survie éventuelle à l'intérieur de protozoaires dans des conditions d'anaérobiose. Le but de cette étude a été d'explorer la survie éventuelle d'archaea méthanogènes à l'intérieur d'un protozoaire rencontré fréquemment dans la cavité buccale et dont l'implication dans la maladie parodontale reste à ce jour controversée. Dans le cadre de ma thèse de doctorat en chirurgie dentaire, une première partie préliminaire de cette étude a été entreprise.

II MATERIEL ET METHODE

II.1 Les données médicales

Les prélèvements ont été réalisés dans le service d'odontologie de l'hôpital de la Timone à Marseille. Ils ont été recueillis chez des patients majeurs, des deux sexes et qui présentaient ou non une maladie parodontale au moment des prélèvements.

Cette étude a été soumise au préalable à l'approbation du comité d'éthique de l'Institut Hospitalier Universitaire (IHU) de Marseille. Elle a reçu l'approbation du comité d'éthique sous le numéro 2016-011.

Il s'agit de patients se présentant dans l'unité de parodontologie pour un bilan parodontal ou une consultation préventive. Un formulaire d'information et de consentement a été remis à chaque patient pour les informer de l'objet de l'étude et recueillir leur accord

L'examen clinique et radiologique a été effectué pour évaluer si le patient présentait ou non une maladie parodontale. Dans l'affirmative, l'observation des éléments cliniques ont permis de classer la forme de la maladie (chronique ou agressive) ainsi que sa sévérité (légère, modérée, sévère). Les patients présentant une gingivite sont considérés comme sain du fait qu'ils ne présentent pas de poches parodontales supérieur à 3 mm comme les patients non atteints par les parodontopathies.

Un questionnaire est effectué auprès des patients pour obtenir des données d'ordre général comme l'âge, la profession, le sexe, les antécédents médicaux, la prise d'antibiotique, la dernière glycémie connue du patient s'il était diabétique et l'habitude tabagique (évaluée en nombre de cigarettes par jours). Ce questionnaire a permis également de recueillir des données parodontales, nous renseignant sur l'existence d'un traitement parodontal antérieur, la présence d'inflammation, d'abcès parodontaux, de mobilité dentaire, de récessions. Un recueil des mesures de pertes d'attaches parodontales est également présent.

II.2 Les prélèvements

Des curettes de Gracey stériles ont été utilisées pour recueillir la plaque bactérienne des patients. Les instruments sont appliqués contre la surface radiculaire, le côté tranchant vers la dent. Une fois que le fond de la poche est atteint, l'instrument est tracté de manière verticale et contre la dent, afin de prélever le matériel biologique qui constituera l'échantillon. Il est ensuite placé dans un tube contenant un milieu de transport stérile et anaérobie pour être analysé à l'IHU Méditerranée Infection par madame Elisabeth Sogodogo (doctorante à l'IHU) dans les plus brefs délais pour éviter de le contaminer. Ces échantillons sont ensuite classés en fonction des critères cités précédemment.
Des indices spécifiques ont été définis pour évaluer l'état parodontal : évaluation de l'inflammation gingivale, de la présence de la plaque dentaire, de la présence de tartre, du niveau clinique de l'attache parodontale, des mesures de profondeur de poches. Ces indices spécifiques sont utilisés dans les études épidémiologiques et en pratique quotidienne pour « quantifier » rapidement et suivre l'évolution de l'état parodontal des patients. Ce qui nous permet de classer la forme de la maladie.

La forme chronique est caractérisée par la formation de poches parodontales supérieures à 3 mm C'est la forme la plus fréquente des parodontites, anciennement appelée parodontite de l'adulte en opposition avec la parodontite juvénile. On utilise aujourd'hui le terme chronique, car on la retrouve aussi chez l'enfant malgré qu'elle soit le plus souvent détectée chez l'adulte. On observe une perte osseuse plus progressive que pour la parodontite chronique. Ce qui conduira à avoir une diminution du volume osseux dite « horizontale ». Elle est dite localisée lorsque moins de 30 % des sites mesurés sont atteints, et généralisée si on observe des poches de plus de 3 mm sur plus de 30 % des sites. Sa sévérité est appréciée en fonction de la perte d'attache, elle est légère si la perte moyenne est comprise en 3 et 5 mm, modérée entre 5 et 7 mm, sévère si la perte est supérieure à 7 mm.

La forme agressive anciennement appelée juvénile est moins dépendante de l'âge. Sa progression est rapide et aboutit à des lésions dites « verticales ».

Les micro-organismes que l'on retrouvent dans ce type de parodontite sont le plus souvent très virulents et appartiennent au complexe rouge de Socransky (6) , la forme est moins dépendante de l'hygiène bucco-dentaire du patient, mais plus de la composition de la flore parodontale.

Les antécédents médicaux sont importants à connaître, car certaines parodontites peuvent être associées à une hémopathie (leucémie) ou à une maladie génétique (syndrome de Down) (2).

La prise d'antibiotiques est importante car elle modifie la flore. De plus, comme décrit précédemment, les micro-organismes étudiés sont très sensibles à ces derniers. Pour cette raison ce facteur était un critère de non inclusion dans cette étude.

Les autres facteurs comme l'hygiène, l'âge, le sexe, l'habitude tabagique ou le diabète doivent être connus pour mieux qualifier la maladie. Car en effet, ils peuvent masquer les symptômes ou majorer les lésions.

Il a été mis en évidence une relation significative entre le niveau d'hygiène bucco-dentaire et l'état parodontal : il existe une relation significative entre la présence de plaque dentaire (biofilm) et de tartre, et l'apparition de poches profondes et de pertes d'attache. On peut observer une diminution significative du recours à des soins complexes quand le niveau d'hygiène est meilleur. En effet, une des premières mesures du traitement parodontal consiste en un enseignement des manœuvres du maintien d'hygiène bucco-dentaire (12).

En ce qui concerne l'âge, on peut observer que dans la tranche d'âge des 16-24 ans le nombre de sextants sains est significativement plus important que

chez les sujets âgés de 75 ans et plus. L'âge accentue significativement la maladie parodontale (13).

D'autre part, il a été montré une relation significative entre la hauteur d'os alvéolaire, la vitesse de destruction osseuse et la consommation de tabac (14). De plus, la fumée de cigarette provoque une vasoconstriction des vaisseaux sanguins qui tend à masquer les symptômes qui poussent les patients à consulter.

Par ailleurs, en moyenne on retrouve significativement moins de plaques dentaires, de gingivites et de poches parodontales chez les femmes que chez les hommes. Cet état parodontal meilleur chez les filles est significativement relié à une meilleure hygiène (15).

Pour finir, on parlera du diabète qui est une maladie métabolique se caractérisant par une hyperglycémie chronique. Il s'agit d'une pathologie touchant plus de 2 millions de personnes en France et dont il existe plusieurs types, cependant, qu'il s'agisse d'un diabète de type 1 ou 2 les mêmes anomalies parodontales sont retrouvées. En effet, les patients diabétiques de type 1 et de type 2 ont significativement plus de gingivites, de tartre, et ont des profondeurs de poches, des pertes d'attache, des pertes osseuses significativement plus importantes que les non diabétiques (16)

Dans cette étude, afin de faciliter la classification des parodontites, on choisira un système simple pour regrouper les patients. Ils seront disposés en 4 groupes :(17)

Case Definitions Proposed for Population-Based Surveillance of Periodontitis*

Case	Definition†
No periodontitis	No evidence of mild, moderate, or severe periodontitis
Mild periodontitis	≥2 interproximal sites with AL ≥3 mm, and ≥2 interproximal sites with PD ≥4 mm (not on same tooth) or one site with PD ≥5 mm
Moderate periodontitis	≥2 interproximal sites with AL ≥4 mm (not on same tooth), or ≥2 interproximal sites with PD ≥5 mm (not on same tooth)
Severe periodontitis	≥2 interproximal sites with AL ≥6 mm (not on same tooth) and ≥1 interproximal site with PD ≥5 mm

* These definitions are now commonly referred to as the CDC–AAP case definitions for surveillance of periodontitis.
† Third molars excluded; total periodontitis is defined as the sum of mild, moderate, and severe disease.

AL (Attachment loss) : distance entre la jonction émail-cément et le fond du sulcus ou de la poche parodontale

PD (Probe depht) : distance entre le bord gingivale et le fond du sulcus ou la poche parodontale

Figure 7 : Classification des parodontites selon Eke 2012 (18)

II.3 Extraction de l'ADN

Le matériel biologique prélevé : les prélèvements de plaque bactérienne peuvent provenir de plusieurs poches parodontales et sont regroupés dans un même tube Hungate stérile propre à chaque personne prélevée.
Chaque tube contient 250 µL de milieu de transport et le prélèvement de plaque auquel on a ajouté une masse de 0,3 g de billes lavées à l'acide (B106 mm, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). La suspension obtenue est ensuite agitée afin d'obtenir une lyse mécanique dans un appareil FastPrep BIO 101 (Qbiogène, Strasbourg, France) au niveau 6.5 pendant deux minutes. Ensuite 200 µL de solution tampon TL, 1,5 ml de OB Protéase de E.Z.N.A. et le kit ADN tissulaire (OMEGA, biotek, Norcross, USA) ont été ajoutés.
Le mélange obtenu est mis à incuber pendant une nuit à 56°C. Après un deuxième cycle de lyse mécanique, le mélange obtenu est incubé pendant soixante minutes à 70°C. L'ADN ainsi extrait est élué avec 100 µL de solution tampon d'élution, puis est stocké à -20°C.

II.4 Biologie moléculaire

Le séquençage après amplification génique par PCR est une étape clé pour mettre en évidence la présence des micro-organismes recherchés dans les échantillons. Pour la réaliser il faut d'abord faire une amplification du gène de l'ARNr 16S, pour cela on a utilisé les amorces suivantes : SDArch0333aS15 (5'-TCCAGGCCCTACGGGG-3') SDArch0958aA19 (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3')

Les réactions de séquençage ont été effectuées à l'aide à l'aide de Big-Dye Terminator, version 1.1, ADN du kit de séquençage en cycle, conformément aux instructions du fabricant (Applied Biosystems, Foster City, USA).
Les séquences nucléotidiques ont été assemblées à l'aide du logiciel Chromas Pro, version 1.7 (Technelysium Pty Ltg., Tewantin , Australie) et comparées à la base du programme BLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)./).

II.5 Hybridation in situ par fluorescence (FISH)

L'hybridation fluorescente in situ (FISH) est une méthode de détection utilisée pour cibler les acides nucléiques (ARN et ADN) dans les cellules et les tissus. Cette méthode utilise des sondes marquées au fluorochrome complémentaire de la cible, ainsi que la microscopie à fluorescence.
Pour cette étude nous avons utilisé un protocole dérivé d'un protocole de FISH pour des bactéries(19). Un volume de 10 µL de l'échantillon a été déposé sur une lame de verre, mis à sécher à l'air ambiant, puis fixé avec 20 µL de paraformaldéhyde à 4% pendant trente minutes. Ensuite, un volume de 20 µL d'une solution de lysosyme (Sigma) à 10g/L a été ajouté à l'échantillon. Ce mélange est incubé trente minutes à 37°C. Puis 5 µL de protéinase K (Sigma) ont été ajoutés ; l'ensemble a été incubé pendant encore cinq minutes, à 37°C.

Après lavage de la lame avec de l'eau distillée, il a été incorporé : un volume de 10 µL d'une solution contenant 1 µL de la sonde Arch915 marquée au Alexa fluor-546 et qui est spécifique du gène de l'ARNr 16S Archaeal (10 µmol/L), 1 µL de la sonde mcrA (10 µmL/L), 5 µL de tampon d'hybridation (4x SSC, 10% de sulfate de dextrane, 1 mM d'EDTA, 25% de formamide, 300 ng/mL d'ADN de sperme de saumon et 1x solution de Denhart) (Sigma-Aldrich), 1 µL de solution contenant 0,1% de Tween 20 et 0,1% deTriton X-100 (Euromedex, Souffelweyersheim, France), 2 µL d'eau distillée

Ensuite, la lame de verre a été recouverte d'une lamelle collée avec de l'adhésif Fixogum (Marabu, Bietigheim-Bissingen, Allemagne). Elle est incubée à 65°C pendant dix minutes, puis à 37°C pendant vingt heures. Une fois le processus d'hybridation terminé, la lame est immergée dans une série de bains de citrate de sel de sodium (4X, 2X, 1X et 0,5X) pendant cinq minutes dans chaque bain à température ambiante. Enfin, la lame est recouverte d'une lamelle couvre-objet et observée à l'agrandissement 100 fois à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica DMI 6000, Nanterre, France).

III RESULTATS

III.1 Les prélèvements

Douze patients ont été prélevés ; les prélèvements ont été anonymisés et numérotés de façon aléatoire : 900, 754, 349, 397, 800, 257, 744, 000, 899, 809, 056 et 729. Parmi ces douze prélèvements, 6 provenaient de patients contrôles (900, 754, 349, 397, 800, 257, 744) et 6 provenaient de patients atteints de parodontites (744, 000, 899, 809, 056 et 729). Parmi les 6 patients présentant des parodontites, 2 présentaient une parodontite sévère : 744 et 000 ; les autres patients présentaient une parodontite modérée : 899, 809, 056 et 229.

III.2 Recherche de protozoaire à l'état frais

Dans cette phase préliminaire, la recherche de protozoaire a été réalisée par microscopie optique à l'état frais. 1/12 prélèvements (900) a permis d'observer des protozoaires à l'état frais. Il n'a pas été possible de différencier *Trichomonas tenax* ou *Entamoeba gingivalis.* Il n'a pas été possible de détecter d'archaea méthanogène dans ce prélèvement. Par ailleurs la mise en culture de ce prélèvement n'a pas permis non plus d'observer d'archaea.

III.3 Mise en culture des prélèvements :

La mise en culture des prélèvements dans des conditions anaérobies n'a pas permis d'observer de colonies après 45 jours.

III.4 Détection moléculaire d'archaea méthanogènes

La recherche d'archaea méthanogènes par PCR du fragment (SDArch0333aS15 / SDArch0958aA19) de 625 bp a permis d'observer 4 / 12 prélèvements positifs (800, 744, 000 et 056). Le séquençage de ces quatre amplifias a confirmé qu'il s'agissait bien de *Methanobrevibacter oralis*.

III.5 Hybridation in Situ par Fluorescence (FISH)

La coloration au DAPI, marqueur universel de l'ADN, a été observé dans 3 / 4 des prélèvements en détection moléculaire. Pour ces 3 prélèvements, nous avons observé très clairement la présence d'archaea marquées en vert par la sonde spécifique toutes archaea (ARC915), leur présence a notamment été confirmée par le marquage d'une sonde spécifique des archaea méthanogènes visant le gène *mcr*A commun à toutes les archaea méthanogènes (marquage en rouge). La combinaison des marquages montre clairement la présence d'archaea méthanogènes dans les trois prélèvements issus de poches parodontales **(Figure 8).**

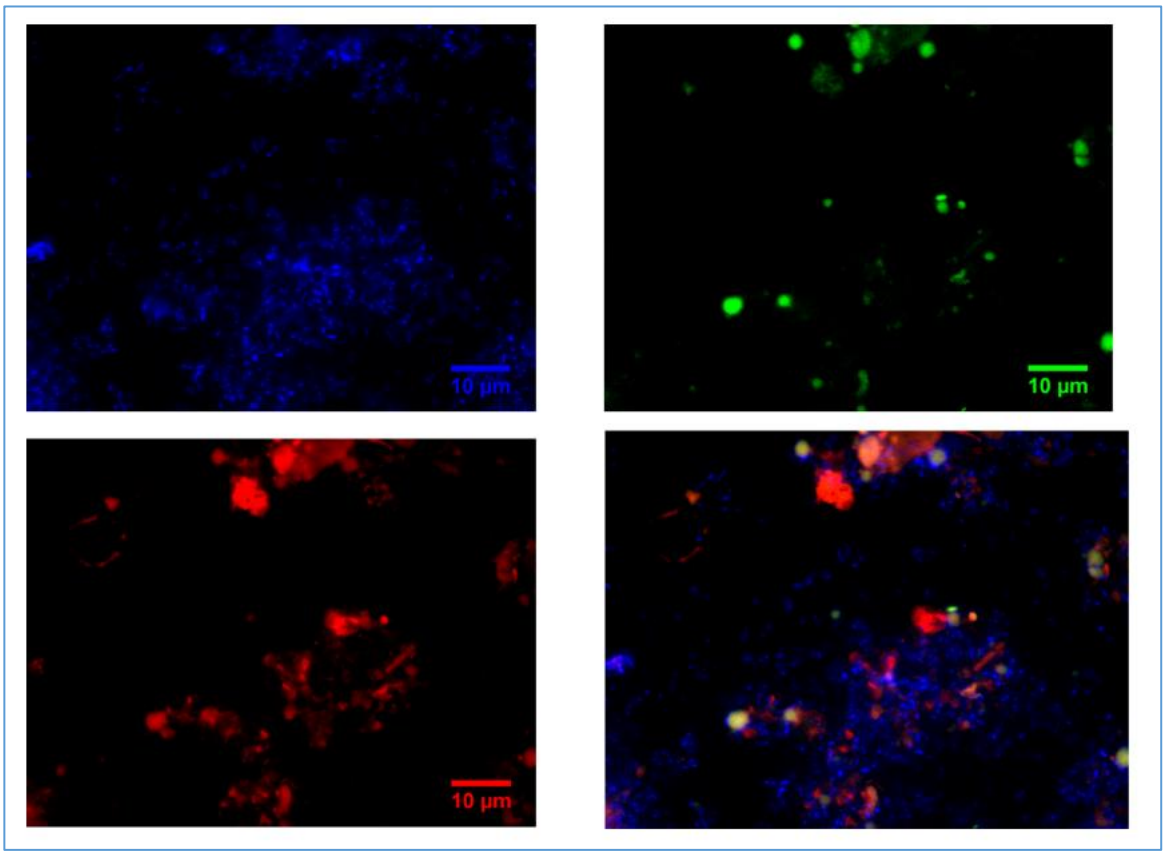


Figure 8 : Fluorescence in situ hybridation pour la détection d'archaea méthanogènes dans un prélèvement de poche parodontale. (A) DAPI marqueur universel de l'ADN (blue) ; (B), la sonde universelle d'archaea ARC 915 (red) ciblant 16s rRNA. (C) la sonde methanogène (green) ciblant le gène mcrA. (D) couleurs combinées. Barre d'échelle : 10 µm.

L'ensemble des résultats de PCR, séquençage et culture pour les douze prélèvements de poches parodontales a été regroupé dans le **Tableau 1**

Echantillons	PCR	Séquençage 16s	FISH	Culture
900	-			-
754	-			-
349	-			-
397	-			-
800	+	*Methanobrevibacter oralis*	+	-
257				
744	+	*Methanobrevibacter oralis*	+	-
000	+	Methanobrevibacter oralis	+	-
899				-
809				-
056	+	*Methanobrevibacter oralis*		-
729				-

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des résultats de PCR, séquençage et culture pour les douze prélèvements de poches parodontales

IV DISCUSSION

Methanobacter oralis a été détecté par PCR sur 4 des 12 prélèvements réalisés, dont 3 chez les patients présentant des poches parodontales. Le quatrième prélèvement positif pour la détection de M. oralis provenanit d'un patient contrôle. Ces résultats vont dans le sens de de la littérature puisque les éléments rapportés de la littérature nous donnent approximativement un taux de détection de *Methanobrevibacter oralis d'environ* 40 % chez les patients atteints par les maladies parodontales et de 5 % chez les patients contrôles ne présentant pas de poches parodontales (20).

L'observation microscopique a permis d'observer des protozoaires à l'état frais sur 1/12 prélèvements. Par ailleurs, il n'a pas été possible de différencier *Trichomonas tenax* ou *Entamoeba gingivalis.* Il n'a pas été possible non plus de détecter d'archaea méthanogène dans ce prélèvement. De plus, la mise en culture de ce prélèvement n'a pas permis non plus d'observer d'archaea. La présence de protozoaires ne semble pas être corrélée à la détection d'archaea méthanogènes.

Par ailleurs, la mise en évidence par FISH de *Methanobrevibacter oralis* a été confirmée pour 3 des 4 échantillons positifs en PCR et valide partiellement la présence de *M. oralis* dans la cavité buccale. Cette mise en évidence par FISH concerne aussi bien des malades (744, 000) qu'un patient contrôle (800). Cet élément va également dans le sens des études précédentes qui montrent la présence d'archaea méthanogènes chez des contrôles sains. Mais ces derniers résultats ne permettent pas d'établir une relation avec les protozoaires de la cavité buccale.

En outre on a isolé des protozoaires de la cavité buccale sans pouvoir les différencier : *Trichomonas tenax* ou *Entemoeba gingivalis* uniquement dans l'échantillon (900). Celui-ci provient d'un patient appartenant au groupe contrôle. Ceci ne va pas dans le sens de l'hypothèse formulée avant cette étude, puisque que dans la littérature, les travaux rapportent la présence de l'un ou l'autre de ces 2 parasites détectés chez environ 20 % de la population et 35% chez les patients présentant une parodontite. Nous aurions dû donc les retrouver dans davantage d'échantillons (21).

Plusieurs éléments peuvent expliquer cette différence. D'une part, le faible nombre d'échantillons analysés apparait évident, d'autre part, il existe surement un biais quant à la détection de ce parasite. En effet seul la technique de détection par microscopie optique a été choisie. Une autre approche aurait pu être entreprise avec l'emploi de techniques plus sensibles telles que la PCR (21), la FISH ou la microscopie confocale (22).

En effet cette dernière joue un rôle prépondérant en microbiologie. Alors qu'un microscope classique ne peut imager qu'un seul plan focal et donc produire une image en 2D, la microscopie confocale permet de suivre la dynamique 3D dans les cellules vivantes avec une haute résolution temporelle et spatiale en imageant simultanément différents plans focaux au sein du spécimen. L'utilisation de cette technique aurait permis de multiplier les plans focaux et ainsi d'augmenter les chances qu'un spécimen apparaisse sur un plan et soit donc détecté avec en plus une meilleure définition (23).

Un autre biais possible, porte sur le recrutement des patients. D'une part, tous les patients ont été recrutés en un seul site, le service odontologie de l'hôpital de la Timone et d'autre part, tous les prélèvements, y compris, les patients contrôles ont été recrutés dans le contexte d'une consultation médicale. On peut imaginer que les patients consultant dans un milieu hospitalier ne sont pas représentatifs de la population générale. Il nous est apparu que pour améliorer la qualité des résultats de cette étude, il pourrait être utile de multiplier les sites de prélèvement et recruter les patients contrôles en dehors de toutes consultations médicales.

A ce stade de l'étude, aucune analyse statistique n'a pu être effectuée. En effet le faible nombre d'échantillons examinés à ce jour ne permettra pas d'avoir une puissance statistique nécessaire pour avancer une conclusion.

Bien que les premiers résultats n'aillent pas dans le sens de l'hypothèse formulée initialement de la survie des archaea méthanogènes dans les protozoaires de la cavité buccale, cette voie d'exploration reste à creuser car ces microorganismes anaérobies sont détectés en biologie moléculaire aussi bien chez des patients contrôles à partir de prélèvements de plaque bactérienne dans le sulcus (0 à 3mm) ou des prélèvements de salive (24). Dans ces deux types de prélèvements, on peut imaginer que les conditions d'anaérobiose ne sont pas strictes et malgré cela, les archaea méthanogènes survivent. Pour

apporter des d'informations contributives cette étude doit être prolongée sur un plus grand nombre de prélèvements très ciblés. Notre travail préliminaire aura permis déjà d'apporter quelques éléments d'information permettant un meilleur choix des prélèvements ainsi qu'une orientation pour le meilleur choix des techniques.

Au-delà de ce travail, la détection des archaea dans la cavité buccale et leur participation à la maladie parodontale en général parodontite (25) et péri-implantite (26) reste discutée. Leur détection dans des abcès sinusiens (27), abcès du cerveau (28) et détection dans le sang (données non publiées) évoque une maladie infectieuse systémique non élucidée à ce jour. Une meilleure compréhension du fonctionnement de ces microorganismes dans la cavité buccale et en particulier avec les protozoaires apporterait des éclaircissements contributifs.

V ANNEXES

FORMULAIRE D'INFORMATION

PROTOCOLE DENT

Etude entrant dans le champ d'application de la loi Mattei (article 666-8)

Madame, Monsieur,

Vous allez avoir un prélèvement destiné à faire le diagnostic de votre maladie.
Les examens que nous réalisons sont destinés à améliorer le diagnostic, la prise en charge et la surveillance de votre traitement. Il est possible que nous utilisions, de façon anonyme les échantillons prélevés. Ceci afin de tester d'autres méthodes de diagnostic permettant une prise en charge plus précoce ou d'étudier des éléments permettant de mieux comprendre la pathologie.
Le compte rendu des examens réalisés pourra être utilisé d'une façon tout à fait anonyme, pour être publié à des fins scientifiques. De plus, il est possible que votre cas (sans que l'on puisse vous reconnaître) soit utilisé pour une publication scientifique qui bénéficiera à la connaissance médicale.
Aucun prélèvement supplémentaire ne sera effectué, nous vous demandons l'autorisation d'utiliser les reliquats d'échantillons pour faire des recherches complémentaires plutôt que de les éliminer.

Madame/Monsieur……
J'ai bien lu que mon observation pouvait être utilisée a des fins de recherche et que les prélèvements faits, dans le cadre du suivi de ma pathologie, pouvaient être utilisés anonymement à des fins de recherche.

Fait à Marseille, le

Dans tous les cas votre anonymat sera préservé selon les recommandations de la CNIL.

Version du 09 mars 2011

N° de fiche :

Date du prélèvement :

QUESTIONNAIRE PATIENT

(avant thérapeutique parodontale)

Données Générales

Date de naissance : ../../..... Sexe : Homme ☐ Femme ☐

Profession :

Fumeur: Non ☐ Fumeur irrégulier ☐ <10 ☐ 10-19 ☐ 20 ☐ >20 cigarettes/jour

Antécédents médicaux ☐ :.....

Si **diabète,** indiquer la dernière glycémie connue :.....

Traitements systémique ou local ☐ :.....

Etat dentaire (score)

Données Parodontales : non oui

Traitement parodontal antérieur ☐ ☐ date : ../../..

Présence d'**inflammation** (saignement au sondage) ☐ ☐ localisée ☐ généralisée ☐

Présence de **plaque dentaire** (*quantité*) ☐ ☐ + / ++ / +++

Présence de **tartre** (*quantité*) ☐ ☐ + / ++ / +++

Présence de **récessions** (*nombre de dents concernées*) ☐ ☐ 1 2 3 4 5 +

Présence de **mobilité** (*nombre de dents concernées*) ☐ ☐ 1 2 3 4 5 +

Présence d'**abcès parodontal** ☐ ☐

Perte d'attachement la plus grave (mm) :

→ **Diagnostic parodontal** : Parodontite chronique ☐

Parodontite agressive ☐

Parodontite nécrotique ☐

Parodontite généralisée (sites atteints > à 30%) ☐

Parodontite localisée (sites atteints < à 30%) ☐

Prélèvement : Selon les **Status radiologique** dentaire et les **Sondages parodontal**

(choix des dents et de la face de prélèvement, noter la profondeur de poche du site prélevé)

11 M / V / D / L	**21** M / V / D / L	**31** M / V / D / L	**41** M / V / D / L
12 M / V / D / L	**22** M / V / D / L	**32** M / V / D / L	**42** M / V / D / L
13 M / V / D / L	**23** M / V / D / L	**33** M / V / D / L	**43** M / V / D / L
14 M / V / D / L	**24** M / V / D / L	**34** M / V / D / L	**44** M / V / D / L
15 M / V / D / L	**25** M / V / D / L	**35** M / V / D / L	**45** M / V / D / L
16 M / V / D / L	**26** M / V / D / L	**36** M / V / D / L	**46** M / V / D / L
17 M / V / D / L	**27** M / V / D / L	**37** M / V / D / L	**47** M / V / D / L
18 M / V / D / L	**28** M / V / D / L	**38** M / V / D / L	**48** M / V / D / L

VI BIBLIOGRAPHIE

1. Zitzmann NU, Ramseier CA, Weiger R, Walter C. Parodontite. Forum Médical Suisse. 27 févr 2013;13(09):183-6.

2. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. Annals of Periodontology. 1999;4(1):1-6.

3. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. Journal of Clinical Periodontology. 2018;45(S20):S162-70.

4. Sund-Levander M, Forsberg C, Wahren LK. Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review. Scandinavian Journal of Caring Sciences. 2002;16(2):122-8.

5. Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. Advances in Colloid and Interface Science. nov 2018;261:1-14.

6. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000. 2005;38(1):135-87.

7. Zawadzki PJ, Perkowski K, Padzik M, Mierzwińska-Nastalska E, Szaflik JP, Conn DB, et al. Examination of Oral Microbiota Diversity in Adults and Older Adults as an Approach to Prevent Spread of Risk Factors for Human Infections [Internet]. BioMed Research International. 2017 [cité 7 févr 2019]. Disponible sur: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/8106491/

8. Maritz JM, Land KM, Carlton JM, Hirt RP. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? Trends in Parasitology. juill 2014;30(7):333-41.

9. Schneider RE, Brown MT, Shiflett AM, Dyall SD, Hayes RD, Xie Y, et al. The Trichomonas vaginalis hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. International Journal for Parasitology. nov 2011;41(13-14):1421-34.

10. Benchimol M, Engelke F. Hydrogenosome behavior during the cell cycle in Tritrichomonas foetus. Biology of the Cell. 1 juill 2003;95(5):283-93.

11. Fox GE, Magrum LJ, Balch WE, Wolfe RS, Woese CR. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1 oct 1977;74(10):4537-41.

12. Goldberg M, Ardouin J-L, Barrandon Y, Bernimoulin J-P, Bonnaure-Mallet M, Bouvet J-P, et al. Maladies parodontales: thérapeutiques et prévention. :315.

13. Feres M, Teles F, Teles R, Figueiredo LC, Faveri M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. Periodontology 2000. 1 oct 2016;72(1):30-53.

14. Bergström J, Eliasson S. Cigarette smoking and alveolar bone height in subjects with a high standard of oral hygiene. Journal of Clinical Periodontology. 1987;14(8):466-9.

15. Shiau HJ, Reynolds MA. Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: A Systematic Review. Journal of Periodontology. 1 oct 2010;81(10):1379-89.

16. Mealey BL. Influence of periodontal infections on systemic health. Periodontology 2000. 1999;21(1):197-209.

17. Case Definitions for Use in Population-Based Surveillance of Periodontitis - Page - 2007 - Journal of Periodontology - Wiley Online Library [Internet]. [cité 7 févr 2019]. Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1902/jop.2007.060264

18. Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the Case Definitions for Population-Based Surveillance of Periodontitis. Journal of Periodontology. 1 déc 2012;83(12):1449-54.

19. Loukil A, Kirtania P, Bedotto M, Drancourt M. FISHing Mycobacterium tuberculosis Complex by Use of a rpoB DNA Probe Bait. Journal of Clinical Microbiology. 1 oct 2018;56(10):e00568-18.

20. Nguyen-Hieu T, Khelaifia S, Aboudharam G, Drancourt M. Methanogenic archaea in subgingival sites: a review. APMIS. 2013;121(6):467-77.

21. Benabdelkader S, Andreani J, Gillet A, Terrer E, Pignoly M, Chaudet H, et al. Specific clones of Trichomonas tenax are associated with periodontitis. PLOS ONE. 11 mars 2019;14(3):e0213338.

22. Wheeler RJ. High-speed multifocal plane fluorescence microscopy for three-dimensional visualisation of beating flagella. bioRxiv. 11 mars 2019;573485.

23. Abrahamsson S, Chen J, Hajj B, Stallinga S, Katsov AY, Wisniewski J, et al. Fast multicolor 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy. Nature Methods. janv 2013;10(1):60-3.

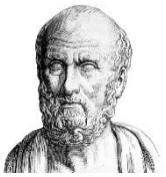
24. Grine G, Terrer E, Boualam MA, Aboudharam G. Tobacco-smoking-related prevalence of methanogens in the oral fluid microbiota. Scientific Reports. 2018;8:9197.

25. Real-Time PCR Quantification of Methanobrevibacter oralis in Periodontitis [Internet]. OpenAIRE - Explore. [cité 5 avr 2019]. Disponible sur: https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId=od_____267::693f407815829a60a13b8a17a88e27a2

26. Belkacemi S, Mazel A, Tardiyo D, Tayitian P, Stephan G, Bianca G, et al. Peri-implantitis-associated methanogens: a preliminary report. Scientific Reports. 2018;8:9447.

27. Sogodogo E, Fellag M, Loukil A, Nkamga VD, Michel J, Dessi P, et al. Nine Cases of Methanogenic Archaea in Refractory Sinusitis, an Emerging Clinical Entity. Front Public Health [Internet]. 2019 [cité 5 avr 2019];7. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2019.00038/full

28. Drancourt M, Nkamga VD, Lakhe NA, Regis J-M, Dufour H, Fournier P-E, et al. Evidence of Archaeal Methanogens in Brain Abscess. Clinical Infectious Diseases. juill 2017;65(1):1-5.



SERMENT MEDICAL

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'HIPPOCRATE.

Je promets et je jure, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine Dentaire.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

J'informerai mes patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des connaissances pour forcer les consciences.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois déshonoré et méprisé de mes confrères si j'y manque.

DELENNE Stéphane - Archaea méthanogènes et protozoaires de la cavité buccale : étude préliminaire

Th. : Chir. dent. : Marseille : Aix –Marseille Université : 2019

Rubrique de classement : Parodontologie

Résumé :
Objectif : Cette thèse a eu pour objectif d'étudier la relation entre la présence de *Trichomonas tenax, Entomoeba gingivalis et Methanobacter oralis* dans les poches parodontales et la corrélation à la maladie parodontale.
Méthode : Douze prélèvements de poches parodontales ont été réalisés : six issus de patients présentant une maladie parodontale et 6 issus de patients témoins. Les prélèvements ont été examinés en microscopie optique sans préparation et analysés en biologie moléculaire.
Résultats : *Methanobacter oralis* a été détecté sur 4 / 12 (33%) prélèvements réalisés, dont 3 chez les patients présentant des poches parodontales. Un protozoaire a été observé en microscopie optique dans 1 prélèvement où la biologie moléculaire n'a pas permis de retrouver d'archaea. Il n'a pas été possible de différencier *Trichomonas tenax* ou *Entamoeba gingivalis.*
Discussion et conclusion : Le faible nombre d'échantillons n'a pas permis de tirer des conclusions statistiquement significatives. En outre, le faible nombre de protozoaires observé nous pousse à réévaluer nos techniques de détection.

Mots clés :
Archaea méthanogènes – Protozoaire – Parodontite - *Methanobacter oralis* - *Trichomonas tenax*

DELENNE Stéphane - Archaea methanogens and protozoa of the oral cavity: preliminary study

Abstract:
Objective: The aim of this thesis was to study the relationship between the presence of *Trichomonas tenax*, *Entomoeba gingivalis* and *Methanobacter oralis* in periodontal pockets and the correlation to periodontal disease.
Method: Twelve periodontal pocket samples were taken: six from patients with periodontal disease and six from control patients. The samples were examined by optical microscopy without preparation and analyzed in molecular biology.
Results: *Methanobacter oralis* was detected on 4/12 (33%) samples taken, including 3 in patients with periodontal pockets. A protozoan was observed by optical microscopy in 1 specimen where molecular biology did not reveal archaea. It was not possible to differentiate *Trichomonas tenax* or *Entamoeba gingivalis*.
Discussion and conclusion: The small number of samples did not allow statistically significant conclusions to be drawn. In addition the low number of protozoa observed pushes us to reevaluate our detection techniques.

MeSH :
Archaea methanogens – Protozoan – Periodontisis - *Methanobacter oralis* - *Trichomonas tenax*

Adresse de l'auteur :
Ornaso
20243 SERRA-DI-FIUMORBO