

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIC ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد
UNIVERSITÉ DE TLEMCCEN



Université ABOU BEKR BELKAID - TLEMCCEN
Faculté de MEDECINE
Département de MEDECINE DENTAIRE

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences Médicales

Discipline : Prothèse Dentaire

« Etude comparative de l'effet antifongique entre
l'association Carvacrol - Eugénol et le Miconazole contre
la stomatite sous prothétique chez l'édenté total
appareillé »

Présentée par :

Imane AZZOUNI

Soutenue publiquement le 12/ 10 /2020

Les membres de jury :

<u>Présidente :</u>	Pr Hafidha GUENDIL	Faculté de Médecine d'Oran
<u>Membres :</u>	Pr Latifa MERDES	Faculté de Médecine d'Annaba
	Pr Khadidja MAKRELOUF	Faculté de Médecine d'Oran
	Pr Latifa HENAOUI	Faculté de Médecine de Tlemcen
<u>Directeur :</u>	Pr Nouredine SENOUCI	Faculté de Médecine d'Oran
<u>Co-Directrice :</u>	Pr Djamila BOUZIANE	Faculté de Médecine d'Oran

Année 2020



THÈSE

Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences Médicales

Discipline : Prothèse Dentaire

« Etude comparative de l'effet antifongique entre
l'association Carvacrol - Eugénol et le Miconazole contre
la stomatite sous prothétique chez l'édenté total
appareillé »

Présentée par :

Imane AZZOUNI

Soutenue publiquement le 12/ 10 / 2020

Les membres de jury :

<u>Présidente :</u>	Pr Hafidha GUENDIL	Faculté de Médecine d'Oran
<u>Membres :</u>	Pr Latifa MERDES	Faculté de Médecine d'Annaba
	Pr Khadidja MAKRELOUF	Faculté de Médecine d'Oran
	Pr Latifa HENAOUI	Faculté de Médecine de Tlemcen
<u>Directeur :</u>	Pr Nouredine SENOUCI	Faculté de Médecine d'Oran
<u>Co-Directrice :</u>	Pr Djamila BOUZIANE	Faculté de Médecine d'Oran

Année 2020

« *REMERCIEMENTS* »

Je rends grâce, avant tout, à Allah Tout-puissant qui nous a donné la santé, la patience et la volonté durant ces années de vie et d'études afin d'accomplir ce modeste travail.

A notre Présidente de jury

Madame le Professeur Hafidha GUENDIL

Professeur des Universités à la Faculté de Médecine d'Oran

Option : Prothèse Dentaire

Chef de Service de Prothèse Dentaire CHU Oran

Présidente du comité scientifique du Département de Médecine Dentaire

Vous nous faites un grand honneur en acceptant aimablement la présidence de cet honorable jury.

Au cours des années de ma formation, j'ai pu, par vos enseignements, admirer votre haute compétence clinique et scientifique, votre disponibilité, votre modestie exemplaire, et votre dynamisme qui n'ont d'égal que vos extraordinaires qualités.

Veillez accepter, Madame le Professeur, toute la reconnaissance que nous vous témoignons. Mes remerciements les plus chaleureux.

A notre membre jury

Madame le Professeur Latifa MERDES

*Professeur des Universités à la Faculté de Médecine de Annaba
Chef de service de Prothèse Dentaire CHU Annaba.*

Vous nous faites un grand honneur d'être présente parmi nous à Tlemcen malgré la distance, en vous remerciant d'avoir accepté de juger ce travail.

Votre modestie et votre compétence n'ont pas d'égal, je tiens à vous adresser mes sincères remerciements pour votre disponibilité, et vos précieux conseils qui m'ont aidé dans la démarche de cette recherche.

Veillez recevoir, Madame, l'expression de ma gratitude et ma profonde estime.

A notre membre du jury

Madame le Professeur Khadidja MAKRELOUF

*Professeur des Universités à la Faculté de Médecine d'Oran
Service de Parodontologie CHU Oran*

Nous sommes ravis de vous compter comme membre de ce jury et nous vous remercions pour avoir accepté notre invitation.

Vous nous faites l'honneur de bien vouloir étudier avec attention ce travail.

Veillez accepter, Madame le Professeur, l'expression de mon profond respect et de mes chaleureux remerciements.

A notre membre du jury

Madame le Professeur Latifa HENAOUI,

*Maitre de Conférence « A » en Epidémiologie à la Faculté de Médecine de Tlemcen.
Chef Unité d'Epidémiologie clinique - Service d'Epidémiologie*

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger parmi les membres de jury.

Je vous remercie de juger ce travail, par vos compétences professionnelles et vos qualités humaines. Vous avez apporté les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche.

Vos corrections et critiques étaient pertinentes et constructives, et m'ont été d'une grande aide dans l'accomplissement de ce modeste manuscrit.

Veillez trouver ici, Madame, l'expression de ma reconnaissance la plus chaleureuse et de mon extrême gratitude.

A mon Maître et Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Nouredine SENOUCI,

Professeur des Universités à la Faculté de Médecine d'Oran

Option : Prothèse Dentaire

Chef de service de Prothèse Dentaire,

Cher Maître, vous m'avez fait un grand honneur en acceptant de diriger et de me confier ce travail, vous avez encadré ce travail avec beaucoup de passion et d'enthousiasme.

Je vous remercie infiniment pour votre patience, votre rigueur, votre disponibilité, votre gentillesse et vos judicieux conseils tout au long de mon parcours, qui m'ont permis de toujours me poser de nouvelles questions, et pour le temps passé à m'expliquer les bases d'une bonne recherche et ainsi d'avancer dans mon projet

Vous m'avez constamment encouragé dans mon cursus de formation et maintenant dans ma progression, en même temps que j'ai apprécié votre grand humanisme.

Vous avez su me transmettre la passion de la Prothèse Dentaire.

Vos qualités professionnelles et humaines me servent d'exemple ; Veuillez croire Monsieur le Professeur, à l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon grand respect.

A ma Co- directrice de thèse

Madame le Professeur Djamilia BOUZIANE,
Professeur des Universités à la Faculté de Médecine d'Oran
Option : Parodontologie
Membre du Comité Scientifique du Département de Médecine Dentaire
Membre Fondateur de l'Académie Algérienne de Médecine Dentaire

Madame, j'ai été touché par le grand intérêt que vous avez porté à ce sujet, et ce dès les premières ébauches ; Je vous remercie pour l'orientation, et la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon port.
Vos compétences, vos exigences et vos encouragements, m'ont grandement stimulé et ont contribué à alimenter ma réflexion, vos conseils de rédaction ont été très précieux.
Je vous suis très reconnaissante.

Veuillez trouver dans ce travail un hommage vivant à votre haute personnalité.

Sincères remerciements.

Mes remerciements s'étendent également à notre Maître

Le Professeur Mohammed BOUZIANE

Professeur Emérite

Directeur de de Laboratoire de Recherche « Biomatériaux Dentaires et de Technologie »

De m'avoir accueillie au sein de son équipe au laboratoire de recherche, et de nous avoir fourni le matériel et le consommable nécessaire à la réalisation des différentes manipulations.

Que ce travail soit le gage de notre respectueuse reconnaissance et de notre profond attachement.

Je vous prie de croire Monsieur le Professeur, à l'expression de nos respectueux hommages.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude :

- Au ***Professeur Sophie GANGLOFF*** de m'avoir accordé la possibilité d'intégrer son équipe au laboratoire Biomatériaux et inflammation en site osseux « BIOS » à l'Université de Reims Champagne- Ardenne lors d'un stage pratique.
- Au ***Docteur Halima KERDJOUJ*** qui m'a accueillie au sein de son équipe, grâce à qui j'ai fais de belles rencontres. Grâce à elle, je garde de très bons souvenirs. Qu'elle soit assurée de ma sincère et profonde reconnaissance.
- Au ***Docteur Hassan REMMAL*** pour sa gentillesse, son encadrement, son temps et sa confiance, de m'avoir beaucoup appris et de m'avoir encouragé.
- Au ***Professeur Cedric MAUPRIVEZ***, Je suis très reconnaissante de sa disponibilité, de sa rigueur et de ses compétences scientifiques.
- Au ***Docteur Fanny REFFUVEILLE*** , je la remercie pour son aide et pour sa gentillesse.

Je remercie tous les membres du Laboratoire BIOS pour leurs conseils, leur bonne humeur et leur gentillesse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'intervention, consciente, d'un grand nombre de personnes, que je souhaiterai ici remercier chaleureusement :

- ❖ **Pr Chahrazed BEKHCHI**, Professeur à la Faculté de Biologie, pour qui les conseils qu'elle m'a prodigués, la patience, et la confiance qu'elle m'a témoigné, ont été déterminants dans la réalisation de ce travail de recherche.
- ❖ **Dr Souhila GUENDOZ**, Maître assistante en pharmacie galénique, j'ai apprécié le temps passé en ta compagnie, tu m'as beaucoup apporté tant sur le plan professionnel que personnel.
- ❖ **Dr Abdennour RABAH**, Assistant en parasitologie et mycologie, qui a contribué activement à ce travail, pour ta disponibilité, je te remercie sincèrement.
- ❖ **Dr Naima GUELLIL**, Chef de Service de Prothèse Dentaire de Tlemcen, pour votre collaboration, vos encouragements et votre précieuse aide. Merci pour tout.
- ❖ Un hommage exceptionnel à **Madame Zakia OUSSADIT**, Ancienne Maître de conférence en Prothèse Dentaire que DIEU lui accorde un prompt rétablissement.
- ❖ **Pr Fouad OUDGHIRI**, Chef de Département de Médecine Dentaire de Tlemcen, pour vos efforts à vouloir développer notre département, et votre disponibilité, en vous exprimant mon entière reconnaissance quant à votre aide et soutien au sein du département.
- ❖ **Pr Ahmed Noureddine FOUATIH**, Chef de Département de Médecine Dentaire D'Oran, de m'avoir ouvert les portes du département, ce qui m'a permis d'entrer en contact avec les enseignants et mener à bien mon travail.

Laboratoires de Recherche :

- « Biomatériaux dentaires et de Technologie » Faculté de Médecine d'ORAN,
Chef de Laboratoire Professeur Mohammed BOUZIANE.

- « Produits Naturels, Equipe 4 » Faculté de Biologie de TLEMCEM,
Chef d'équipe Professeur Chahrazed BEKHCHI.



- Laboratoire de l'équipe « Chimie & Biomasse » de l'Université de Corse ,
Professeur Félix TOMI.



- « Biomatériaux et inflammation en site osseux » Pôle santé - Université de Reims Champagne-Ardenne, *Chef de Laboratoire Professeur Sophie GANGLOFF .*



Laboratoires Pharmaceutiques :

- Novageneric® de nous avoir permis de travailler avec le Miconazole®
- EL KENDI® pour les produits chimiques et les tubes de conditionnements.

Enfin, J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre à mes questions durant mes recherches.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Dédicaces

A mon rayon de soleil Youssef la lumière de ma vie et la source de mon énergie, et mes deux anges neveux Nihel et Younes.

A mes très chers parents, pour votre patience, votre aide, votre soutien constant dans les moments difficiles, et vos sacrifices durant toutes ces longues années.

A mes adorables sœurs Nadjet et Hidayet, pour votre présence, votre soutien, et votre aide, car je sais que je peux compter sur vous.

A mon époux et mes beaux-frères pour votre générosité et votre soutien inconditionnel.

A mes amis, mes collègues et à tous ceux qui me sont chers.

Enfin, j'adresse une pensée à la mémoire de mes grand- parents paternels et maternels.

Sommaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	I
LEXIQUE DES TERMES SCIENTIFIQUES.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ANNEXES	XIV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : Revue Bibliographique	4
1.1. Port de la Prothèse et la Stomatite Prothétique	5
1.1.1. Description et épidémiologie de la stomatite prothétique	5
1.1.2. Etiopathogénie.....	6
1.1.2.1. Facteurs Locaux	6
a) <i>Existence et ancienneté des appareils dentaires</i>	6
b) <i>Réaction allergique</i>	7
c) <i>Hygiène bucco-prothétique insuffisante</i>	7
d) <i>Biofilm prothétique à Candida</i>	8
□ Facteurs de virulence des <i>Candida</i>	12
▪ <i>Dimorphisme</i>	13
▪ <i>Adhérence et la persistance du Candida albicans</i>	13
▪ <i>Formation du Biofilm Prothétique</i>	13
▪ <i>Sécrétion des aspartyl -protéinases et des phospholipases</i>	13
e) <i>Port continu de la prothèse amovible</i>	14
f) <i>Nature de la surface prothétique</i>	14
g) <i>Salive et Acidose prothétique</i>	14
1.1.2.2. Facteurs systémiques prédisposants à la stomatite prothétique	16
a. <i>Sénilité</i>	16
b. <i>Ecosystème chez le sujet âgé édenté</i>	17
c. <i>Pathologies d'ordre générale</i>	18
d. <i>Tabac</i>	18
1.1.3. Mécanisme de défense	19
1.1.4. Diagnostic et Classification de la stomatite prothétique	20
1.1.5. Gestion thérapeutique des stomatites prothétiques	22

1.1.5.1.	Education thérapeutique des patients	22
a.	<i>Amélioration de l'hygiène des prothèses amovibles</i>	22
b.	<i>Brossage du palais</i>	23
c.	<i>Retrait prothétique nocturne</i>	24
1.1.5.2.	Traitement anti fongique.....	24
1.1.5.3.	Traitement prothétique.....	29
a.	<i>Traitement pré prothétique</i>	29
b.	<i>Traitement prothétique</i>	29
c.	<i>Traitement post prothétique</i>	30
1.2.	Généralités sur les huiles essentielles et leur utilisation en phytothérapie	31
1.2.1.	Activités biologiques des huiles essentielles.....	32
1.2.2.	Plante aromatique de <i>Thymus fontanesii</i>	33
1.2.2.1.	Données botaniques de la plante.....	33
1.2.2.2.	Données phytochimiques de l'huile essentielle	34
1.2.2.3.	Données biologiques de l'huile essentielle	34
1.2.2.4.	Chémotype de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	35
1.2.3.	Plante aromatique de <i>Syzygium aromaticum</i>	36
1.2.3.1.	Données botaniques de la plante.....	36
1.2.3.2.	Données phytochimiques de l'huile essentielle	37
1.2.3.3.	Données biologiques de l'huile essentielle	37
1.2.4.	Mécanisme d'action fongiotoxique des huiles essentielles.....	38
1.2.5.	Effet combinatoire des huiles essentielles, et des huiles avec des agents antifongiques médicamenteux	39
1.2.6.	Activité antifongique in vitro et in vivo du Carvacrol et de l'Eugénol contre le <i>Candida albicans</i> dans le traitement de la stomatite prothétique	40
1.2.7.	Toxicité des huiles essentielles	41
1.3	Etat de la question	43
1.4	Problématique	44
CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes		45
2.1	Type d'étude	46
2.2	Critères retenus	46
2.3	Objectifs	47
2.3.1	Objectif principal.....	47
2.3.2	Objectifs secondaires.....	47

2.4	Etude Epidémiologique	48
2.4.1	Population d'étude.....	48
2.4.2	Lieu et durée de l'étude	48
2.4.3	Déroulement de l'étude	48
2.4.3.1	Examen clinique et Prélèvement mycologique	48
a.	<i>Etape 1 : Ecouvillonnage de l'intrados de la prothèse maxillaire</i>	49
b.	<i>Etape 2 : Conservation et transport du prélèvement</i>	50
2.4.3.2	Examen du Prélèvement au laboratoire de Mycologie	50
a.	<i>Etape 1 : Examen direct des levures sous microscope optique</i>	50
b.	<i>Etape 2 : Culture des levures sur milieu chromogène et pré identification des souches Candida</i>	51
	<input type="checkbox"/> <i>Culture des levures sur milieu chromogène</i>	51
	<input type="checkbox"/> <i>Pré identification des souches Candida</i>	53
c.	<i>Etape 3 : Identification des souches Candida non-albicans par test complémentaire</i>	55
d.	<i>Etape 4 : Conservation des souches Candida albicans pour la phase expérimentale</i>	56
2.5	Etude Expérimentale	58
2.5.1	Population d'étude.....	58
2.5.2	Lieu et durée de l'étude	58
2.5.3	Déroulement de l'étude	58
2.5.3.1	Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antifongique des huiles essentielles et de leur combinaison	59
a.	<i>Récolte des plantes aromatiques et extraction des huiles essentielles</i>	59
	<input type="checkbox"/> Calcul de la teneur des plantes en huiles essentielles	61
b.	<i>Analyse chimique des huiles essentielles</i>	61
	<input type="checkbox"/> Par Chromatographie en Phase Gazeuse	61
	<input type="checkbox"/> Par Spectrométrie de Masse	61
c.	<i>Etude in vitro de l'activité antifongique des huiles essentielles et de leur combinaison</i>	61
	<input type="checkbox"/> Préparation des inoculums	62
	<input type="checkbox"/> Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles par la méthode de diffusion sur disque : méthode de l'aromatogramme	63
	<input type="checkbox"/> Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales fongicides des huiles essentielles	65

❑	Détermination des concentration inhibitrice semi-maximale des huiles essentielles .	69
2.5.3.2	Etude comparative <i>in vitro</i> de l'activité antifongique d'un gel préparé avec le Miconazole.....	69
a.	<i>Formulation et préparation d'un gel buccal à base des huiles essentielles étudiées.</i>	69
b.	<i>Etude comparative de l'activité antifongique de notre gel préparé avec le Miconazole</i>	70
c.	<i>Etude comparative de l'activité anti-biofilm de notre gel préparé avec le Miconazole</i>	72
❑	Réalisation et désinfection des pastilles en résine acrylique	72
❑	Formation du biofilm à <i>Candida albicans</i>	73
❑	Procédure de dénombrement des colonies sur la pastille témoin	74
❑	Traitement des pastilles infectées avec le gel préparé et le Miconazole	76
2.5.3.3	Etude <i>in vitro</i> de la toxicité de notre gel préparé.....	78
a.	<i>Etude in vitro de la cytotoxicité du gel préparé</i>	78
❑	Procédure de la culture cellulaire des Fibroblastes gingivaux humains.....	78
❑	Mise en contact des Fibroblastes gingivaux humains avec le gel buccal.....	80
❑	Appréciation qualitative : Observation de la morphologie des fibroblastes gingivaux	81
❑	Appréciation quantitative : Mesure de la viabilité cellulaire.....	82
❑	Appréciation quantitative : Mesure de la quantité d'ADN cellulaire.....	84
❑	Appréciation quantitative : Mesure de la Cytotoxicité.....	85
b.	<i>Etude histologique et immunohistochimique des prélèvements muqueux placés au contact du produit</i>	86
❑	Etude histologique par coloration Hématéine Eosine Safran	88
❑	Etude immunohistochimique de l'activité apoptotique par identification de la Caspase 3 clivée.....	88
2.6	Variables de l'étude et Critères de jugement	90
2.6.1	Mesure du critère de jugement principal.....	90
2.6.2	Mesure des critères de jugement secondaires	90
2.6.3	Définition des variables.....	90
2.7	Aspects éthiques.....	91
2.8	Collecte des données.....	91
2.9	Traitement des données et Analyses statistiques	92
2.10	Retombées de l'étude.....	93
CHAPITRE 3 : Résultats et Interprétation		94

3.1.	Résultats de l'Étude Epidémiologique	95
3.1.1.	Données Sociodémographiques des patients.....	96
3.1.1.1.	Répartition de la population selon le sexe	96
3.1.1.2.	Répartition de la population selon âge.....	96
3.1.2.	Répartition de la population selon le motif de consultation.....	97
3.1.3.	Étude de la pathologie de la stomatite prothétique.....	97
3.1.3.1.	Prévalence de la stomatite prothétique	97
3.1.3.2.	Répartition de la population d'étude selon les caractéristiques cliniques de la stomatite prothétique.....	98
3.1.3.3.	Répartition de la population selon le type et le grade de la stomatite prothétique	98
3.1.4.	Étude des facteurs de risque	99
3.1.4.1.	Répartition de la population selon l'ancienneté des prothèses	99
3.1.4.2.	Étude de l'hygiène bucco-prothétique	99
a.	<i>Répartition de la population d'étude selon les méthodes de nettoyage des prothèses</i>	99
b.	<i>Répartition de la population d'étude selon la fréquence d'entretien des prothèses</i>	100
c.	<i>Répartition de la population d'étude selon le brossage du palais</i>	100
3.1.4.3.	Répartition de la population selon le port prothétique nocturne.....	101
3.1.4.4.	Répartition de la population d'étude selon le type de conservation de la prothèse	101
3.1.4.5.	Répartition de la population d'étude selon la consommation du tabac	102
3.1.4.6.	Étude mycologique	102
a.	<i>Distribution du nombre total de levures retrouvées sur les prothèses maxillaires</i> ..	102
b.	<i>Distribution du nombre d'espèces de Candida retrouvées sur les prothèses maxillaires</i>	103
c.	<i>Répartition de la population d'étude selon le type d'espèce Candida</i>	104
3.1.4.7.	Étude de la relation entre le nombre d'espèces et l'intensité clinique de la stomatite prothétique.....	105
3.1.4.8.	Résultat de l'indication du traitement prothétique.....	106
3.2.	Résultats de l'Étude Expérimentale	107
3.2.1.	Partie 1 : Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles étudiées	107
3.2.1.1.	Résultats de l'Extraction des huiles essentielles.....	107
3.2.1.2.	Résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles.....	108
a.	<i>L'huile essentielle des parties aériennes de Thymus fontanesii</i>	108

<i>b.</i>	<i>L'huile essentielle des boutons floraux de Syzygium aromaticum.....</i>	110
3.2.1.3.	Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles et de leur combinaison.....	111
<i>d.</i>	<i>Résultats de la méthode de diffusion sur disques : Méthode de l'aromatogramme .</i>	111
<i>b.</i>	<i>Résultats des concentrations minimales inhibitrices et fongicides par la méthode de micro dilution.....</i>	111
<i>c.</i>	<i>Résultats de la concentration semi- inhibitrice.....</i>	117
3.2.2.	Partie 2 : Résultats de l'efficacité et de la cytotoxicité du gel buccal préparé.....	119
3.2.2.1.	Contrôle et analyse du produit fini « gel buccal »	119
3.2.2.2.	Résultats de l'efficacité du gel buccal préparé	119
<i>a.</i>	<i>Résultats de la comparaison de l'activité antifongique du gel buccal versus Miconazole</i>	119
<i>b.</i>	<i>Résultats de la comparaison de l'action anti-biofilm à Candida du gel buccal versus Miconazole</i>	120
3.2.2.3.	Résultats de l'étude de la cytotoxicité	124
<i>a.</i>	<i>Résultats de l'appréciation qualitative de la cytotoxicité</i>	124
<i>b.</i>	<i>Résultats de l'appréciation quantitative de la cytotoxicité.....</i>	126
□	<i>Résultats de l'étude de la viabilité cellulaire</i>	126
□	<i>Résultats de la quantification de l'ADN cellulaire.....</i>	127
□	<i>Résultats de l'étude de la mortalité cellulaire.....</i>	128
3.2.2.4.	Résultats de l'étude histologique des greffons palatins placés au contact du produit	129
3.2.2.5.	Résultats de l'étude immunohistochimique des greffons palatins placés au contact du produit	130
CHAPITRE 4 : Discussion.....		131
4.1. Discussion sur l'Etude Epidémiologique		133
4.1.1.	Discussion des données socio démographiques : sexe, âge.	134
4.1.2.	Discussion sur le motif de consultation.....	134
4.1.3.	Discussion sur la pathologie de la stomatite prothétique	135
4.1.3.1.	Discussion de la prévalence de la stomatite prothétique et de son type et grade	135
4.1.3.2.	Discussion sur les caractéristiques cliniques de la stomatite prothétique.....	138
4.1.4.	Discussion des facteurs de risques locaux.....	138
4.1.4.1.	Ancienneté des prothèses	138
4.1.4.2.	Hygiène bucco-prothétique et le brossage du palais.....	139

4.1.4.3.	Port prothétique nocturne.....	140
4.1.4.4.	Type de conservation des prothèses.....	140
4.1.4.5.	Tabagisme	141
4.1.5.	Discussion des résultats mycologiques	142
4.1.6.	Discussion de la relation entre les espèces <i>Candida</i> et le type de la stomatite	147
4.1.7.	Discussion sur le traitement de la stomatite prothétique.....	148
4.2.	Discussion sur l'Etude Expérimentale	150
4.2.1.	Discussion sur l'activité antifongique des huiles essentielles étudiées.....	151
4.2.1.1.	Discussion sur la composition chimique des huiles essentielles	151
<input type="checkbox"/>	Discussion sur l'HE de Thym.....	151
<input type="checkbox"/>	Discussion sur l'HE de Girofle.....	152
4.2.1.2.	Discussion de l'activité antifongique des huiles essentielles et de leur combinaison	153
a.	Discussion sur la sensibilité des souches et de leur diamètre d'inhibition.....	154
b.	Discussion sur les concentrations minimales inhibitrices et fongicides CMI et CMF des huiles étudiées.....	155
4.2.1.3.	Discussion sur la comparaison <i>in vitro</i> de l'efficacité de notre gel buccal et celle du Miconazole.....	159
a.	Discussion sur la comparaison de l'activité anti-fongique.....	159
b.	Discussion de la comparaison de l'efficacité anti biofilm.....	159
4.2.1.4.	Discussion sur la toxicité cellulaire de notre gel buccal	162
4.3.	Validité interne : Biais et limites de notre étude	163
4.3.1.	Points forts de notre étude	163
4.3.2.	Points faibles de notre étude.....	164
4.4.	Validité externe	164
5.	Recommandations Thérapeutiques de la Stomatite Prothétique	165
5.1.	Recommandations préventives au patient de la stomatite prothétique	166
5.1.1.	Lors des étapes de la réalisation prothétique	166
5.1.2.	Consignes post- prothétiques	167
5.2.	Recommandations curatives au clinicien de la stomatite prothétique	168
	CONCLUSION	170
	Références Bibliographiques	174
	Annexes	185
	Résumé	214

Abstract	215
الملخص	216

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

AMM : Autorisation de Mise sur Marché

& : « And » et

ATCC : American Type Culture Collection

C.albi : *Candida albicans*

C.glabr : *Candida glabrata*

C.tropi : *Candida tropicalis*

Candida.sp : Espèces *Candida*

CE₅₀ : Concentration Efficace moyenne provoquant 50% de la mort cellulaire

CHUT : Centre Hospitalier Universitaire de Tlemcen

cf : Abréviation de l'expression latine « confer » qui signifie « se référer à »

CLSI:Clinical and Laboratory Standards Institute(Institut de normalisation clinique et de laboratoire)

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMF : Concentration Minimale Fongicide (létale)

CPG-Ir : Chromatographie en Phase Gazeuse (associé aux Indices de Rétention)

CPG- SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

DCI : Dénomination Commune Internationale

°C : Degré Celsius

Ø : Diamètre

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium ; milieu de culture cellulaire nécessaire au maintien et à la prolifération des cellules.

DMSO : DiMéthylSulfOxyde C₂H₆OS

DO : Densité Optique

ELA : Elastase (enzyme salivaire)

Ex vivo : En dehors de l'organisme vivant, opposé à *in vivo*

∑ : Epaisseur

FGH : Fibroblastes Gingivaux Humains

FIC : Concentration Inhibitrice Fractionnaire

FICI : Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire

FFC : Concentration Fongicide Fractionnaire

FFCI : Indice de Concentration Fongicide Fractionnaire

g : Gramme

h : Heure

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène

HE(s) : Huile(s) Essentielle(s)

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice semi maximale, qui réduit 50% de la croissance cellulaire.

ISO : International Standardisation Organisation (Organisation internationale de normalisation)

IP : Institut Pasteur

IZ : Inhibition zone (Zone d'Inhibition)
 λ : Longueur d'onde
LDH : Lactate DésHydrogénase
MCF : Minimal Concentration Fongicide
ml : Millilitre
mm : Millimètre
min : Minute
MPO : MyéloPérOxydase
n : Nombre d'échantillon.
Nbre : Nombre
NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité national des normes de laboratoire clinique)
nm: Nanometre
NO : Oxyde Nitrique
Ny: Nystatine
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase chain reaction
PMAM : PolyMéthAcrylate de Méthyle
% : Pourcentage
PTA : Prothèse Totale Adjointe
QS : Quorum Sensing
Rd : Rendement en huile essentielle
s : Secondes
SVF : Sérum de Veau Fœtal
SP: Stomatite Prothétique
SEM: Standard Error of the Mean (Ecart type moyen)
SPO : PerOxydases Salivaires
SPSS : Statistical Package for the Social Sciences
TCPS : Tissue Culture PolyStyrène, surface en polystyrène utilisée pour la culture cellulaire
T° : Température
UFC : Unité Formant Colonies
URCA : Université de Reims Champagne-Ardenne, France
UV : UltraViolet
v : Volume
Vs : Versus
 μ L : Microlitre
 μ L/mL : Microlitre par Millilitre
***** : Résultat significatif
****** : Résultat plus significatif
*******: Résultat statistique très significatif

LEXIQUE DES TERMES SCIENTIFIQUES

Absorbance : Grandeur physique sans unité mesurant la capacité d'une solution à absorber une onde électromagnétique pour une longueur d'onde donnée, détectée par un spectrophotomètre, elle est directement proportionnelle à la concentration de la substance. Appelée également densité optique

Confluence : C'est le degré d'écartement qui existe entre les cellules adhérentes cultivées en monocouche sur un support approprié. 100 % de confluence décrit un tapis cellulaire ne présentant aucun interstice entre deux cellules, elles se touchent toutes.

Cellules planctoniques : cellules libres, flottantes, non adhérentes.

Cellules sessiles : Cellules qui adhèrent à la surface prothétique, constituant le biofilm prothétique.

Microplaque : Plaque micro titre est une plaque utilisée au laboratoire, peut contenir plusieurs puits : 6, 12, 24, 48, ou 96 puits.

Falcon : Tube en plastique faisant partie du matériel de biologie moléculaire.

Flasque : Bouteille de petite forme aplatie dans sa largeur, utilisée au laboratoire.

Isomère : Composés ayant la même formule d'ensemble, mais des propriétés différentes dues à un agencement différent des atomes dans la molécule.

Mac Farland standard : Standard de turbidité qui sert pour préparer les suspensions des microorganismes.

Microbiote : Ensemble des micro-organismes vivant dans un écosystème donné.

Nom vernaculaire : Nom courant, s'oppose à nom scientifique.

Turbidité : Caractéristique optique d'un liquide, par sa capacité à diffuser ou à absorber la lumière incidente ; désigne la teneur, d'un fluide en matières, qui le trouble.

Organoleptiques : Caractéristiques d'une substance qui sont perceptibles par les organes des sens : saveur, odeur, aspect et consistance.

Emollient : Substance qui amollit, relâche les tissus tendus et calme l'inflammation.

Hygroscopique : Propriété d'une substance lui permettant d'absorber l'humidité de l'air.

LISTE DES TABLEAUX

N°	Tableaux	Page
I.	Dénomination anglo-saxonne de la stomatite prothétique dans le temps	5
II.	Récapitulatif des facteurs de risque locaux et systémiques de la stomatite prothétique	19
III.	Les différentes classifications de la stomatite prothétique	21
IV.	Tableau résumant les différents produits pharmaceutiques indiqués dans le traitement des stomatites prothétiques	27
V.	Gestion thérapeutique des stomatites prothétiques	30
VI.	Caractéristiques botaniques de <i>Thymus fontanesii</i>	34
VII.	Caractéristiques botaniques de <i>Syzygium aromanticum</i>	36
VIII.	Interprétation des résultats de l'examen direct et de la culture	53
IX.	Représentation des espèces <i>Candida</i> sur milieu chromogène	54
X.	Provenance des plantes aromatiques étudiées	59
XI.	Provenance des souches de <i>Candida</i>	61
XII.	Evaluation de l'activité antifongique par méthode de diffusion sur disque : Absence de croissance des levures autour du disque (cercle rouge) formant une zone d'inhibition. Iconographie personnelle - Laboratoire de Produits naturels -Tlemcen.	63
XIII.	Interprétation du diamètre de la zone d'inhibition et activité de l'huile essentielle	63
XIV.	Les différentes concentrations des huiles essentielles testées sur microplaque	65
XV.	Obtention de la CMI (à gauche) et de la CMF (à droite) des huiles de thym et de girofle et de leur combinaison sur boîte Pétri. Iconographie personnelle. Laboratoire BIOS –Université de Reims.	67
XVI.	Interprétation des résultats des tests de cytotoxicité	85
XVII.	Les affinités des colorants HES	87
XVIII.	Caractéristiques différentielles entre la nécrose et l'apoptose	87
XIX.	La répartition de la population d'étude selon l'âge.	94
XX.	Résultats de l'examen mycologique	100

XXI.	Fréquence d'isolement des espèces de <i>Candida</i> (seuls ou associées) isolées des frottis des prothèses de sujets atteints de stomatite prothétique.	103
XXII.	Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites	105
XXIII.	Composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes de <i>Thymus fontanesii</i>	107
XXIV.	Composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle des boutons floraux de <i>Syzygium aromaticum</i> .	108
XXV.	Comparaison du <i>p</i> value de l'effet du thym sur la croissance les <i>Candida albicans</i>	114
XXVI.	Comparaison du <i>p</i> value de l'effet du girofle sur la croissance les <i>Candida albicans</i>	115
XXVII.	Comparaison du <i>p</i> value de l'effet du mélange de thym et girofle sur la croissance les <i>Candida albicans</i>	116
XXVIII.	Tableau récapitulatif des CMI et CMF des huiles essentielles étudiées et de leur combinaison	117
XXIX.	Caractéristiques macroscopiques du gel buccal	119
XXX.	Taux de survie du <i>Candida albicans</i> ATCC 26790 après 24h d'incubation dans les conditions étudiées : résultats de la comparaison de l'activité antifongique (de gauche à droite : témoin, gel base, gel CMF, Miconazole).	120
XXXI.	Comparaison du <i>p</i> value du résultat du nombre de levures planctonique et totales	122
XXXII.	Étude de la viabilité des cellules fibroblastes gingivales humains (FGH) de la muqueuse orale traitées et non traitées par les différents gels. Microscopie optique. Grossissement × 10 (échelle 400µm).	125
XXXIII.	Comparaison des différentes prévalences de la stomatite prothétique chez l'édenté total appareillé, publiées dans le monde (%).	137
XXXIV.	Tableau comparatif des résultats des facteurs de risque rapportés par les différentes études.	142
XXXV.	Tableau comparatif de nos résultats mycologiques avec les études (%)	147
XXXVI.	Tableau comparatif de la composition chimique des différentes huiles essentielles de <i>Thymus fontanesii</i> étudiées en Algérie	152
XXXVII.	Tableau comparatif de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i> étudiée dans le monde	153
XXXVIII.	Comparaison des paramètres antifongiques des huiles essentielles de Thym et de Girofle	158
XXXIX.	Propositions (recommandations) thérapeutiques selon les grades de la stomatite prothétique.	169
XXXX	Tableau de sélection des excipients	203
XXXXI	Composition du produit fini « gel buccal » formulé	206

LISTE DES FIGURES

N°	Figures	Page
1.	Observation microscopique (×1000) du <i>C. albicans</i> sur l'intrados prothétique	8
2.	Schéma d'un biofilm à <i>Candida</i> formé sur une surface polymérique	9
3.	Différentes formes de croissance des <i>Candida sp</i>	10
4.	Observation microscopique des différentes morphologies du <i>Candida albicans</i> (×400) Laboratoire de Mycologie Médicale CHUT.	10
5.	(A) Frottis contrôle de sujet sain ; frottis cytologique buccal de la muqueuse palatine présentant des cellules malpighiennes typiques et des cellules inflammatoires chroniques dispersées (violet foncé)(× 10) (B) Hyphes fongiques d'une stomatite prothétique ; frottis cytologique buccal de la muqueuse palatine montrant une invasion tissulaire des hyphes de <i>Candida</i> (×40)	11
6.	<i>Candida albicans</i> sur milieu Sabouraud- chloramphénicol isolé d'une prothèse amovible recouvrant une stomatite prothétique	12
7.	Les différentes formes cliniques de la stomatite prothétique selon la classification de Newton modifiée.	21
8.	Mécanisme d'action des antifongiques	26
9.	Structure de la molécule d'isoprène	32
10.	Plante <i>Thymus fontanesii</i> (Thym) récoltée en province de Tlemcen	34
11.	Structures chimiques du Thymol et du Carvacrol, groupe des mono terpenoides	36
12.	<i>Syzygium aromaticum</i> à l'état frais et les Clous de girofle : bourgeons floraux séchés	37
13.	Structure chimique de l'Eugénol	37
14.	Diagramme diagnostique divisant la surface du palais en quadrants pour classer l'étendue de l'inflammation	46
15.	Miconazole 2% gel buccal, novageneric®. Iconographie personnelle. Service de Prothèse Dentaire Tlemcen.	49
16.	(A) Site d'échantillonnage de l'intrados prothétique pour les examens mycologiques sur localisé sur trois zones différentes (ligne en pointillé) :zone antérieure , moyenne et postérieure du palais, (B) Ecouvillons dans leurs tubes de transport après prélèvements. Iconographie personnelle- Laboratoire de Mycologie Médicale CHU Tlemcen	50
17.	Procédure de l'observation sous microscope. (A) Homogénéisation de la suspension fongique sur un vortex (B) Mise en place de l'inoculum entre lame et lamelle. (C) Observation sous microscope optique. Iconographie personnelle - Laboratoire de Mycologie Médicale – CHU Tlemcen.	51
18.	Milieu chromogène coulé dans une boîte de Pétri. (B) Ensemencement de l'inoculum sur milieu chromogène à l'aide d'un râteau (C) Incubation des boîtes de Pétri ensemencées dans une étuve à 37°C pendant 48h. Iconographie personnelle - Laboratoire de Mycologie Médicale – CHU Tlemcen	52
19.	Colorations obtenues des <i>Candida</i> sur milieu chromogénique HiCrome™	53
20.	Pré-identification des espèces <i>Candida</i> sur milieu chromogène : (A) souches mono-espèce.	54

	(B) souches pluri espèces : <i>Candida albicans</i> (verte), <i>Candida tropicalis</i> (bleu) et <i>Candida glabrata</i> (blanche). Iconographie personnelle - Laboratoire de Mycologie Médicale – CHU Tlemcen.	
21.	Galerie Auxacolor 2 « BIO-RADE » avant et après identification	55
22.	Organigramme résumant les étapes de la procédure mycologique de notre étude.	56
23.	Colonies de <i>Candida albicans</i> sur milieu de culture Sabouraud - Chloramphénicol	57
24.	Organigramme représentant le déroulement de notre étude épidémiologique	57
25.	Extraction des huiles essentielles de Thym et de Girofle par hydro distillation. Iconographie personnelle - Laboratoire de Produits Naturels – Tlemcen	59
26.	Les huiles essentielles de <i>Thymus fontanesii</i> et de <i>Syzygium aromaticum</i> dans des flacons opaques	60
27.	Mesure de l'absorbance de l'inoculum à 0,12 – 0,15 (106 UFC/mL). Iconographie personnelle - Laboratoire « Produits Naturels » Faculté de Biologie Tlemcen.	62
28.	Illustration d'un aromatoigramme	62
29.	Évaluation de l'activité antifongique par méthode de microdilution sur microplaques de 96puits contenant les échantillons d'HEs :(A) Thym, (B) Girofle, (C) Combinaison de Thym et de Girofle, à différentes concentrations. Iconographie personnelle- Laboratoire BIOS – Université de Reims.	64
30.	Lecteur de microplaque pour la mesure de l'absorbance SPECTROstar Nano (Labtech BMG) servant à la détermination de la CMI. Iconographie personnelle. Laboratoire BIOS – Université Reims Champagne-Ardenne.	65
31.	Schéma représentatif de l'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antifongique des HEs testées par la méthode de micro-dilution sur milieu liquide et de dénombrement de colonies sur milieu gélosé.	68
32.	Gel buccal à la dose CMF et gel de base conditionnés dans des tubes en aluminium. Iconographie personnelle - Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Médecine Tlemcen.	69
33.	Comparaison de l'activité antifongique du gel CMF avec le Miconazole par la méthode de macro-dilution. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS –Université de Reims.	70
34.	Exemple de croissance (condition témoin) et d'inhibition (condition de notre produit) des levures <i>Candida albicans</i> ATCC 26790 sur boîte Pétri . Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS -Université de Reims.	71
35.	(A) : Mise en moufle, ébullition et thermo polymérisation des pastilles en CIRE prédécoupées à l'emporte-pièce. (B) Représentation schématique d'une pastille en résine acrylique (C) : Désinfection des pastilles à la lumière ultraviolet sous une hotte à flux laminaire Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS -Université de Reims.	72
36.	Formation du biofilm à <i>Candida albicans</i> sur les pastilles en résine. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.	73
37.	Procédure de sonication dans un appareil à ultrasons pour décrochage des levures adhérentes aux pastilles. Iconographie personnelle- Laboratoire BIOS, Université de Reims	74

38.	Méthode de dénombrement des colonies de levures sur une boîte de Pétri, à l'aide d'un compteur de colonies. (B) : Exemple de dénombrement des colonies de levures <i>Candida albicans</i> (souche clinique), ayant poussées sur des boîtes de Pétri, qui ont adhérees sur une pastille infectée témoin, avant (T0 : gauche) et après sonication (T5 : droite) , Le milieu était dilué à 10-1 . Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.	74
39.	Traitement des pastilles infectées par les <i>Candida albicans</i> avec les différents gels : GB : gel base, excipient. (-) : milieu contrôle. M : Miconazole. x10 : notre gel concentré 10 fois, puis dilué. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.	75
40.	(A) Inhibition presque totale de la croissance des levures <i>Candida albicans</i> (ATCC 26790) après traitement de la pastille infectée au gel buccal CMF, avant (T0 : gauche) et après sonication (T5 :droite). Les milieux étaient dilué à 10-1 . (B): Inhibition partielle de la croissance des levures <i>Candida albicans</i> (ATCC 26790) après traitement de la pastille infectée au Miconazole, avant (T0 : gauche) et après sonication (T5 :droite). Les milieux étaient dilué à 10-1 Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.	76
41.	Diagramme schématique résumant la manipulation de l'activité anti-biofilm à <i>Candida</i> .	76
42.	Culture primaire et secondaire des fibroblastes gingivaux à partir des explants de la muqueuse orale.	78
43.	Une hotte à flux laminaire et incubateur utilisé pour la culture cellulaire	78
44.	Une culture cellulaire secondaire dans des microplaques de 24puits	79
45.	La pesée des produits avec précision, et préparations des conditions dans le milieu de culture	80
46.	Observation microscopique de la morphologie des cellules : (A) Cellules viables « flèche noire », (B) Cellules mortes « flèche noire »	81
47.	Observation de la morphologie des cellules fibroblaste gingivaux viables sous microscope photonique inversé à écran EVOS XL. Laboratoire BIOS – Université de Reims	81
48.	Illustration de la réaction du WST-1	82
49.	Résultats du test de la cytotoxicité évaluée par « WST-1 » (Mesure de la viabilité cellulaire) Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS -Université de Reims	82
50.	Lecteur de microplaque multi-modes FLUOstar Omega , servant à la mesure de l'absorbance pour les tests du WST-1 et LDH (test de cytotoxicité). Iconographie personnelle- Laboratoire Bios – Université Reims Champagne Ardenne	83
51.	Spectrophotomètre à micro volume Thermo Scientific™ NanoDrop 2000C, servant à la mesure de l'absorbance pour la quantification de l'ADN. Iconographie personnelle. Laboratoire BIOS – Université Reims Champagne Ardenne	
52.	Illustration schématique de la réaction de LDH	84
53.	Résultats du test de la cytotoxicité évaluée par « LDH » (Mesure de la mortalité cellulaire) Iconographie personnelle Laboratoire BIOS -Université de Reims.	84
54.	Découpage du greffon de la muqueuse palatine et mise en place des échantillons dans du sérum physiologique	86

55.	Préparation des lames d'histologie après coloration HES (A), et d'immunohistochimie par identification de la Caspase 3 clivé (B).	88
56.	Schéma représentatif des étapes de notre phase expérimentale	88
57.	Description de la population incluse dans l'étude	93
58.	Répartition de la population d'étude selon le sexe	94
59.	Répartition de la population d'étude selon âge	94
60.	Répartition de la population selon le motif de consultation	95
61.	La prévalence de la stomatite prothétique (SP) dans notre étude. n= cas de stomatite prothétique /échantillon global (nombre de patients appareillés)= 78/238.	95
62.	Répartition de la population d'étude selon les caractéristiques cliniques de la stomatite prothétique. n=78, () nombre de sujets.	96
63.	Répartition de la population selon le type et le grade de la stomatite prothétique. n=78, () nombre de sujets	96
64.	Répartition de la population selon l'ancienneté des prothèses. n=78, () nombre de sujets.	97
65.	Répartition de la population d'étude selon les méthodes de nettoyage des prothèses, n=78, () nombre de sujets.	97
66.	Répartition de la population d'étude selon la fréquence de nettoyage des prothèses, n=78, () nombre de sujets	98
67.	Répartition de la population d'étude selon le brossage du palais, n=78, () nombre de sujets	98
68.	Répartition de la population selon le port prothétique nocturne	99
69.	Répartition de la population d'étude selon la conservation de la prothèse	99
70.	Répartition de la population d'étude selon la consommation du tabac	100
71.	Distribution du nombre total de levures retrouvées sur les prothèses maxillaires des patients atteints de stomatite prothétique. n=78, () nombre d'échantillons.	101
72.	Distribution des espèces <i>Candida</i> en souches mono-espèce et pluri-espèces isolées des prothèses maxillaires. n= 71, () nombre d'échantillon.	101
73.	Fréquence des espèces de levures isolées des prothèses maxillaires des patients atteints de stomatite prothétique. n= 71, () nombre d'échantillon	102
74.	Fréquence des espèces de <i>Candida</i> seul et associé isolées chez les sujets atteints de stomatite. n= 71, (n) nombre d'échantillon.	103
75.	Graphique illustrant la relation entre le nombre des espèces de levures identifiées et l'intensité clinique de la stomatite prothétique selon Newton. Chaque type de la lésion représente la proportion de patients chez lesquels les espèces pures ou associées de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> étaient isolées. p= 0,08. n= 71. () : nombre .	104
76.	Résultat de l'indication du traitement prothétique. n =78. () : nombre .	104
77.	Huiles essentielles de girofle et de thym	105
78.	Comparaison des diamètres de la zone d'inhibition (IZ) de chacune des huiles de Girofle et de Thym avec le Fluconazole, obtenues par méthode de diffusion sur disque.	109
79.	(A): Effet du <i>Thymus fontanesii</i> sur la croissance des <i>Candida albicans</i> cliniques et référencées, évalué par turbidimétrie sur un spectrophotomètre dans des	112

	microplaques de 96 puits. Médiane et valeurs extrêmes, n=7, expériences dupliquées 2 fois. (B): Effet du <i>Thymus fontanesii</i> . sur la croissance des <i>Candida albicans</i> cliniques et référencées, évaluée par turbidimétrie. La ligne en pointillés indique la valeur de contrôle normalisée 100% . Moyenne \pm écart type, n= 7, expériences dupliquées 2 fois	
80.	(A): Croissance des levures évaluée après 24h de culture, par turbidimétrie dans un bouillon de Sabouraud ensemencé par <i>Candida albicans</i> cliniques et référencées, dans différentes concentrations de <i>Syzygium aromanticum</i> , n=7, (volume total par puit: 300 μ L) , expériences dupliquées 2 fois. (B): Effet du <i>Syzygium aromanticum</i> sur la croissance des <i>Candida albicans</i> cliniques et référencées, évaluée par turbidimétrie sur un spectrophotomètre dans des microplaques de 96 puits. La ligne en pointillés indique la valeur de contrôle normalisée 100% . Moyenne \pm écart type, n= 7, expériences dupliquées 2 fois.	113
81.	(A) : Croissance des levures évaluée après 24h de culture, par turbidimétrie dans un bouillon de Sabouraud ensemencé par <i>Candida albicans</i> cliniques et référencées, dans différentes concentrations du mélange des huiles de Girofle et de Thym, n=7, expériences dupliquées 2 fois B): Effet de la combinaison de <i>Syzygium aromanticum</i> et de <i>Thymus fontanesii</i> . sur la croissance des <i>Candida albicans</i> cliniques et référencées, évaluée par turbidimétrie. La ligne en pointillés indique la valeur de contrôle normalisée 100%. Moyenne \pm écart type, n= 7, expériences dupliquées 2 fois.	114
82.	(A): Courbe de croissance des <i>Candida albicans</i> , cliniques et référencées, en fonction des concentrations de l'huile de Girofle, normalisé à la valeur de controle 100%, n=7. B): Courbe de croissance des <i>Candida albicans</i> , cliniques et référencées, en fonction des concentrations de l'huile de Thym, normalisé à la valeur de controle 100%, n=7. C): Taux de survie des <i>Candida albicans</i> , cliniques et référencées, après 24h d'incubation dans différentes concentrations des huiles de Girofle et de Thym mélangées, normalisé à la valeur de controle 100%, n=7, intervalle de confiance 95%.	116
83.	Comparaison de l'aspect du gel buccal préparé avec celui du Miconazole (novageneric®).	117
84.	Comparaison du nombre des levures (UFC/mL) planctoniques (libres) avec celui des levures totales (libres + adhérees) dans les différents milieux des pastilles acryliques traitées et non traitées. Moyenne et écart type. Signification $p < 0,05$. n= 7.	120
85.	(A) : Comparaison du pourcentage des levures ayant adhérees aux pastilles en résine traitées par gel « CMF » et par gel Miconazole. Médiane et valeurs extrêmes. Signification $p < 0,05$. n= 7. (B): Comparaison du pourcentage des levures adhérees aux pastilles en résine traitées par gel « CMF » et par gel Miconazole. Moyenne et écart type. Signification $< 0,05$. n= 7.	121
86.	(A) : Résultats de l'activité métabolique de la culture des fibroblastes gingivaux humains FGH , en précisant la médiane et les valeurs extrêmes pour chaque type de gel. Intervalle de confiance 95% Signification ($p < 0,05$. n = 6.	124

	(B) : Résultats de l'activité métabolique de la culture des fibroblastes gingivaux humains FGH, en précisant la moyenne et l'écart type pour chaque gel testé. Intervalle de confiance 95%.Signification $p < 0,05$. $n = 6$	
87.	(A) : Résultats de la quantification d'ADN dans les cultures des fibroblastes gingivaux humains en présence des différents types de gels, normalisée à la condition de contrôle, en affichant la médiane et les valeurs extrêmes, Signification $p < 0,05$. Intervalle de confiance 95%. $n=6$ (B) : Résultats de la quantification d'ADN dans les cultures des fibroblastes gingivaux humains en présence des différents types de gels, normalisé à la condition de contrôle, en précisant la moyenne ainsi que l'écart type, Signification $p < 0,05$. Intervalle de confiance 95%. $n=6$	125
88.	(A) : Etude de la toxicité des différents gels étudiés sur les cellules fibroblastes gingivaux humains . Résultats l'activité lactate déshydrogénase (LDH) dans les surnageants de culture des FGH en présence des différentes conditions, médiane et valeurs extrêmes. Signification $p < 0,05$. Intervalle de confiance 95% , $n=6$. (B) : Etude de la toxicité des différents gels étudiés sur les cellules fibroblastes gingivaux humains . Résultats l'activité lactate déshydrogénase (LDH) dans les surnageants de culture des FGH en présence des différentes conditions, médiane et valeurs extrêmes. Signification $p < 0,05$. Intervalle de confiance 95% , $n=6$. TCPS : polystyrène des microplaques (condition de témoin)	126
89.	Coupe histologique de la muqueuse palatine traitée par Gel CMF et Excipient ,et non traitée (Témoin), après 24h de culture, et colorée par HES (grossissement $\times 20$), 1: Fine kératose, 2:couche granuleuse, 3: corps muqueux de Malpighi, 4:Crête épithéliale, 5:Membrane basale, 6:Chorion. (La barre d'échelle indique $40\mu\text{m}$)	127
90.	Coupe histologique d'une coloration immunohistochimique par clivage de la caspase 3 clivée (grossissement $\times 20$) montre peu de cellules apoptotiques (flèche jaune) en condition de Gel CMF, d'Excipient et de Témoin. (La barre d'échelle indique $40\mu\text{m}$)	128
91.	Indications du traitement et de la prévention de la stomatite prothétique durant les phases du traitement prothétique.	166
92.	Milieux de culture utilisés dans notre l'étude, (A) : Milieu chromogène HiCrome HIMEDIA™, Laboratoire de Mycologie Médicale CHU Tlemcen. B : Milieu Sabouraud chloramphenicol™ MEDIA® , Laboratoire de Mycologie Médicale CHU Tlemcen. C : Bouillon Sabouraud, Diagnostic Liofilchem® , Laboratoire BIOS, Université de Reims. D : Milieu pour la culture cellulaire des fibroblastes gingivaux. Laboratoire BIOS, Université de Reims	193
93.	Résine thermo polymérisable qui a servie à réaliser les pastilles.	205

LISTE DES ANNEXES

- **Annexe 1** : Formulaire de Consentement Eclairé du Patient (rédigé en Français)183
 Formulaire de Consentement Eclairé du Patient (rédigé en Arabe).....185
- **Annexe 2** : Questionnaire d'Evaluation de l'enquête pré prothétique.....187
- **Annexe 3** : Fiche de Diagnostic Mycologique.....189
- **Annexe 4** : Composition et Présentation des milieux de culture.....190
- **Annexe 5** : Tableau d'interprétation des résultats mycologiques sur Auxacolor2.....192
- **Annexe 6** : Procédure de l'Extraction des huiles essentielles.....194
- **Annexe 7** : Protocole de l'analyse chimique par Chromatographie en Phase Gazeuse
 couplée à la Spectrophotométrie de Masse « CPG-SM ».....195
- **Annexe 8** : Méthode de l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles.....196
- **Annexe 9** : Pré formulation et Formulation du gel buccal.....198
- **Annexe 10** : Réalisation au laboratoire des pastilles en résine acrylique.....203
- **Annexe 11** : Formulaire d'information et de Consentement Eclairé du patient.....204
- **Annexe 12** : Culture cellulaire des fibroblastes gingivaux humains.....205
- **Annexe 13**: Protocole des tests de Cytotoxicité.....207
- **Annexe 14**: Principe des colorations histologique et immunohistochimique209

INTRODUCTION

Introduction

L'espérance de vie a manifestement augmenté ces dernières années, elle est de 77ans en 2018 (70 ans en l'an 2000) publiée par l'Office Nationale des Statistiques [222], ce qui classe les Algériens comme étant le peuple ayant la meilleure espérance de vie du continent africain.

Le vieillissement de la population et l'augmentation de cette espérance de vie dans le monde représentent les principaux facteurs responsables de l'accroissement du nombre des patients édentés totaux, et ce malgré la prévention et des soins conservateurs de plus en plus fréquents et performants, de ce fait l'édentation totale constitue actuellement une infirmité répandue [76, 176].

En 2010, une étude menée par **Rabeira** et *al.* ont rapporté que 56% parmi les 216 patients examinés étaient édentés et que les 95 patients restants possédaient en moyenne 3,22 dents [184]. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) prévoit 30 % d'édentés totaux dans le monde en 2030 [36, 107].

La prothèse complète constitue et reste toujours une solution avérée dans le traitement de cet handicap, pour répondre aux espérances esthétiques et fonctionnels des patients[183, 223]. Selon **HUE** 2004 [107] ,61,5 % des patients sont porteurs de prothèses adjointes ,parmi eux 16,3 % ont une prothèse complète unimaxillaire et 14,3 % une prothèse complète bimaxillaire.

L'insertion en bouche de ce dispositif n'est pas sans conséquences sur l'environnement buccal, une étude à Tlemcen menée par **Oussadit** en 2009 [171] constate que 160 patients consultés sur une période de deux ans, souffraient de lésions chroniques de la muqueuse buccale engendrées par le port d'une prothèse totale amovible, ce qui fait de ces lésions un problème de santé publique. Parmi elles, la stomatite prothétique est rapportée, majoritairement asymptomatique, reconnue comme la lésion la plus fréquente chez les porteurs de prothèses amovibles. Son étiologie est multifactorielle, ayant comme facteur principal la présence d'un agent fongique opportuniste de la cavité orale le *Candida albicans*, retrouvé dans le biofilm prothétique.

Les sujets immunodéprimés sont particulièrement vulnérables aux infections fongiques, chez qui le risque d'une candidémie (infection systémique par infiltration du *Candida* dans le flux sanguin) est présent. En outre, le *Candida albicans* figure parmi les microorganismes responsables des infections nosocomiales.

La prescription des antimycosiques est une des phases de la gestion thérapeutique de la stomatite prothétique. Cependant, plusieurs études ont rapporté une résistance des germes aux produits pharmaceutiques, et une récurrence de la lésion après arrêt du traitement.

Face à cette réalité, des chercheurs se sont penchés vers la voie des produits naturels, plus exactement celle des huiles essentielles dont l'efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée *in vitro* [177, 224]. Ces métabolites représenteraient une nouvelle source de composés actifs réagissant et dégradant par différents mécanismes, la membrane plasmique des microorganismes [203].

On assiste, ces dernières années, à un regain d'intérêt pour les extraits des plantes médicinales et aromatiques. Sachant que l'Algérie est un pays riche par une flore végétale très diversifiée, elle serait plus de 5000 taxons (espèces), sous espèces et hybrides [109] dont plusieurs d'entre elles sont utilisées en médecine traditionnelle Algérienne. Pour cela nous avons souhaité mener cette thèse afin de valoriser une espèce végétale de Thym (*Thymus fontanesii*) poussant spontanément en Algérie surtout dans la région de Tlemcen et démontrer son potentiel antifongique *in vitro*.

Après une synthèse bibliographique de la stomatite prothétique et de son traitement, notre étude aura pour objectif principal de comparer le caractère antifongique d'un gel buccal formulé à partir des huiles essentielles du Thym (*Thymus fontanesii*) (récoltée à Tlemcen) et du Girofle (*Syzygium aromanticum*) (acheté chez un herboriste et dont l'origine serait en Indonésie) contenant le carvacrol et l'eugénol avec celui du Miconazole sur le *Candida albicans* responsable des stomatites prothétiques, ceci dans le but de valoriser une ressource biologique naturelle du nord algérien afin de créer peut être de nouvelles voies de traitement des stomatites prothétiques.

En seconds objectifs, déterminer grâce à des investigations biologiques *in vitro*, les concentrations minimales inhibitrices et fongicides des huiles essentielles dans un intérêt pharmacologique, nous aborderons ensuite une étude de la cytotoxicité des huiles essentielles étudiées. Nous achèverons la partie épidémiologique par une estimation de la prévalence de la stomatite prothétique chez l'édenté total appareillé dans la région de Tlemcen, ainsi que la fréquence du *Candida albicans* selon les types de ces lésions. Enfin dans un intérêt préventif, le profil épidémiologique des sujets avec stomatite prothétique sera décrit.

CHAPITRE 1 :

Revue Bibliographique

1.1. Port de la Prothèse et la Stomatite Prothétique

1.1.1. Description et épidémiologie de la stomatite prothétique

La stomatite prothétique est une forme de candidose induite par une prothèse dentaire, définie comme une réaction inflammatoire chronique affectant les porteurs de prothèses dentaires amovibles aussi bien partielles que totales [76, 205, 220].

Cette lésion était décrite pour la première fois par **Cahn** 1936 sous un nom anglais de « denture sore mouth, » [38], elle a été ensuite rapportée sous de nombreux termes anglais et français (Tableau n° I) , actuellement l'appellation de « stomatite prothétique » est quasi majoritaire.

Tableau n°I : Dénomination anglo-saxonne de la stomatite prothétique dans le temps [148].

Référence	Année	Dénomination anglo-saxonne
Cahn [38]	1936	Denture sore mouth
Classification précoce	-	Denture stomatitis
Lambson et al.[127]	1967	Palatal papillary hyperplasia
Maurizio Dotto [72]	1984	Ouranite sous-prothétique
Samarnayake and MacFarlane [195]	1990	Denture-associated candidosis, Candida-associated denture stomatitis
Mc Cullough and Savage [148]	2005	Denture-induced stomatitis

Source : *McCullough, M. J. Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry. Austr Dental Journa.2005*

Elle se manifeste par un érythème et un œdème de la muqueuse buccale, siégeant surtout à la muqueuse palatine sous une prothèse maxillaire partielle ou complète , et cela est due à l'absence de l'effet protecteur de la salive et de nettoyage de la langue, et enfin à une oxygénation correcte de cette muqueuse ; elle plus rare à la mandibule puisque la quantité de la salive est suffisante et l'action nettoyante de la langue est présente [103, 201].

La stomatite prothétique est la lésion buccale la plus courante chez l'édenté appareillé ,sa prévalence augmente dès la première année du port de la prothèse et qui risque de se compliquer en une stomatite sévère si elles n'est pas traitée[152, 198].

Les études rapportent une prévalence variant de : 25% à 65% [108],entre 6,5 % et77,5% [76], 65% des porteurs de prothèses[1]entre 15 et 70%[95], et 19,5% à 50,6%porteurs de prothèses complètes au Brésil [139, 180]. En moyenne, un tiers des porteurs de prothèses sont touchés par cette pathologie [226], une prévalence de 74,4% est rapportée par une étude à Tlemcen.[171], et une incidence de la SP de 78,8%[198].

Une récente revue systématique rapporte que la stomatite prothétique était la lésion buccale la plus fréquente chez les sujets âgés à 13,3 % [191].

La prévalence et l'incidence de la stomatite prothétique sont plus élevées chez le sujet féminin appareillé [86, 95, 226], l'âge de semble pas être un facteur de risque [226].

Il s'agit de la forme clinique la plus fréquente des mycoses buccales associée au *Candida*, la levure est isolée dans 93 % des cas [76, 89, 105, 177, 186, 201].

De découverte fortuite, la SP est majoritairement non douloureuse, les symptômes se traduisent par un érythème léger ou sévère, chronique de la muqueuse palatine, et un œdème localisé ou généralisé limité à la zone de support de prothèse dentaire souvent avec des bords nettement définis [76] rarement des démangeaisons, ou des sensations de brûlures sont rapportées [95, 105, 194].

La lésion peut être associée à d'autres pathologies, comme la chéilite angulaire décrite par des lésions fissurées des commissures labiales accompagnées d'inconfort et de douleurs [3].

1.1.2. Etiopathogénie

L'étiopathogénie de la stomatite prothétique est multifactorielle [89, 95, 194, 205]. Elle comprend des facteurs locaux et des facteurs systémiques liés à l'hôte.

Les causes d'une apparition de la stomatite prothétique (SP) sont dues : à une agression traumatique des prothèses dentaires [76, 79], une hygiène bucco-prothétique déficiente [76, 89, 122] un port prothétique continu [89, 226], un facteur infectieux [76, 180] et des facteurs systémiques.

1.1.2.1. Facteurs Locaux

a) Existence et ancienneté des appareils dentaires

Le traumatisme et la présence de prothèses ont été répertoriés parmi les principaux facteurs responsables de l'apparition de la stomatite prothétique (SP), l'inflammation jouerait alors le rôle de précurseur à une infection fongique. Les traumatismes à répétition, ou une occlusion mal équilibrée réduisent la résistance des tissus à l'invasion, et augmentent la perméabilité de l'épithélium aux toxines produites par les levures opportunistes. Une stomatite prothétique (SP) de type I peut apparaître après seulement DEUX jours de port prothétique [86, 89, 152, 205].

L'instabilité d'une prothèse mandibulaire risque de causer un traumatisme à la muqueuse palatine et favoriser ainsi le développement de la stomatite prothétique (SP). Selon une étude canadienne, des patients traités par une prothèse mandibulaire stabilisée sur implants souffraient

cinq fois moins de SP, en raison d'une meilleure distribution des charges occlusales et d'une rétention optimale[76, 79].

Il a été démontré que la mise en bouche d'un appareil orthodontique, modifierait l'environnement buccal engendrant une augmentation du nombre de levures en bouche [3, 212].

Selon certains auteurs, la SP semble être liée à l'ancienneté de la prothèse, et non pas au nombre de prothèses renouvelées [226]. Les porteurs de prothèses partielles sont moins à risque de développer une SP que les porteurs de prothèses complètes[205], la prévalence de la SP chez ces patients varie entre 1,1% et 36,7% [76].

Les résultats ont montré que le renouvellement des prothèses et l'amélioration de l'hygiène des prothèses étaient utiles pour le traitement de la stomatite prothétique[180].

Certains chercheurs pensent que la lésion se produit moins souvent sous des prothèses " non traumatiques ", elle serait moins fréquente chez les patients dont les crêtes alvéolaires sont satisfaisantes que chez ceux dont les crêtes sont plates, chez qui le degré de traumatisme prothétique se trouve plus élevé [117].

b) Réaction allergique

Il est difficile pour les auteurs d'écarter la possibilité que la stomatite soit une manifestation d'une réaction allergique au matériau de base de la prothèse qui est l'acrylique, dont l'allergène serait le monomère résiduel, retrouvé plus dans les résines auto-polymérisables que dans les autres résines.

Par ailleurs, dans le cas d'une réaction allergique, la mandibule serait aussi affectée, ce qui est très rarement le cas avec la stomatite, en plus la faible incidence de la réaction allergique à la résine ne correspond pas à la prévalence élevée des stomatites prothétiques. Pour toutes ces raisons, cette étiologie est très peu retenue [103, 198].

c) Hygiène bucco-prothétique insuffisante

Les études démontrent une association claire entre une mauvaise hygiène de la prothèse et la prévalence de la SP (une relation statistiquement significative entre la stomatite prothétique, la présence de levures et l'hygiène des prothèses)[110, 122, 142, 180]. Un simple brossage prothétique est insuffisant pour empêcher la formation du biofilm et maintenir une bonne hygiène bucco prothétique, cependant le trempage des prothèses dans des solutions désinfectantes telle que l'hypochlorite de sodium dilué, avec l'utilisation des microondes ou des ultrasons est requis dans le cadre de l'entretien régulier des prothèses dentaires [219].

Malheureusement la majorité des patients porteurs de prothèses sont des patients âgés et beaucoup d'entre eux ont des déficiences qui rendent difficile le nettoyage régulier des prothèses [95].

Le manque de brossage du palais est aussi répertorié comme facteur étiologique, l'effet protecteur de la salive et l'oxygénation de la muqueuse se trouvent atténués, cette dernière est sujette à des agressions mécaniques et microbiologiques [114].

d) Biofilm prothétique à Candida

La stomatite prothétique (SP) est une infection en rapport avec la présence et le maintien d'un biofilm prothétique [95] ; qui est une communauté de microorganismes mono ou pluri-espèces, structurée et complexe, encapsulée dans une matrice polysaccharidique attachée à une surface biotique vivante ou inerte abiotique formant des structures tridimensionnelles (Fig n°1) [95, 202, 218].

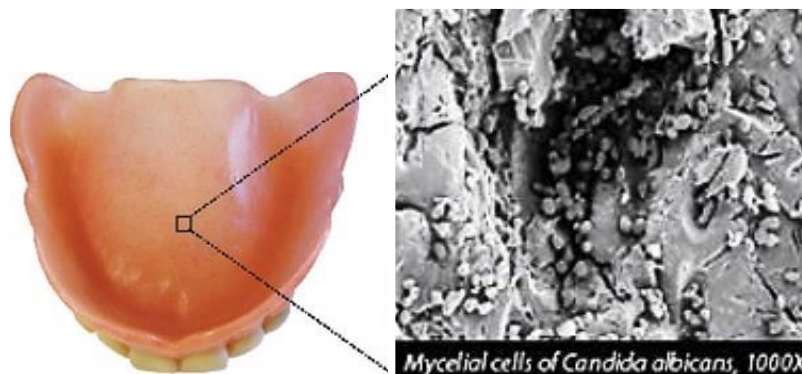


Figure n° 1 : Observation microscopique (×1000) du *C. albicans* mycélium sur l'intrados prothétique [95]

Leur formation se produit en réponse à une variété de signaux, notamment une densité cellulaire élevée, et des contraintes physiques environnementales, connue pour être plus résistante aux mécanismes de défense de l'hôte et aux antibiotiques que les microbes unicellulaires planctoniques (libres), ils représentent une source d'infection permanente pour les patients [129].

La mycose buccale a une influence sur la muqueuse œsophagienne, en effet les prothèses amovibles infectées peuvent entraîner une mycose de la continuité du système digestif comme la gorge et le tractus gastro-intestinal [131, 168].

La formation du biofilm commence par l'adhésion irréversible des cellules planctoniques (libres) à la surface prothétique, en colonisant l'intrados prothétique, suivie par l'apparition de filaments « hyphes ». La sécrétion et l'accumulation d'une matrice extracellulaire est révélatrice de la maturation du biofilm recouvrant la surface et croissant en épaisseur. Enfin les cellules fongiques se détachent du biofilm pour retourner à la suspension planctonique et se disperser dans le milieu (Fig n°2) [13, 52, 186, 202].

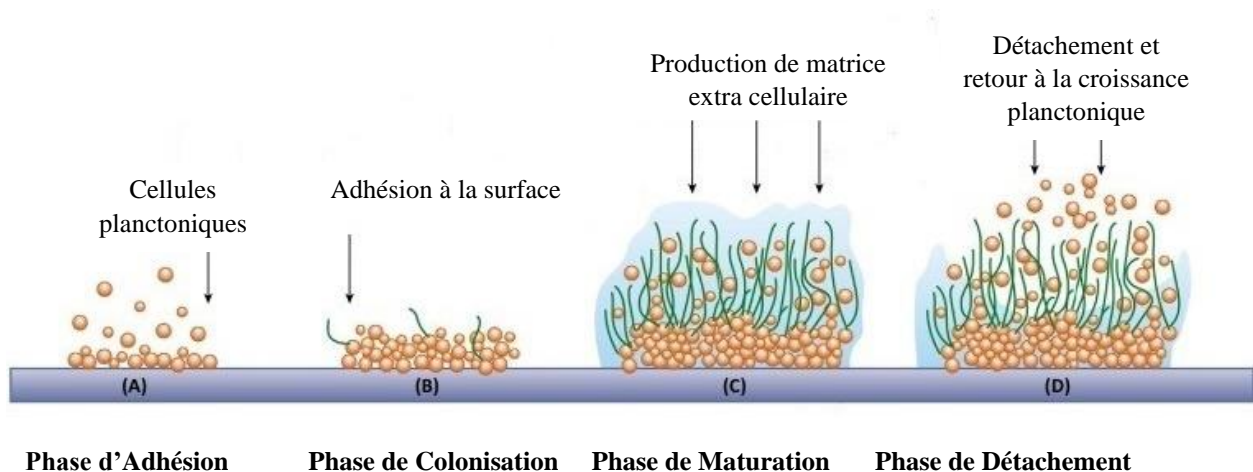


Figure n°2 : Schéma d'un biofilm à *Candida* formé sur une surface polymérique.
(Adapté de Araujo et al. 2017) [13]

Depuis longtemps, les levures *Candida* étaient associées à la stomatite prothétique après isolement mycologique dans 70 à 90% chez des patients diagnostiqués de cette lésion, [57, 89, 180, 194, 220] D'après **Loster**, toute prothèse insérée en bouche est colonisée par le *Candida albicans* [131].

Les espèces *Candida* sont des levures naturellement présentes, en faible quantité, dans la microflore commensale de la sphère oro pharyngée, et sont considérées comme les seuls espèces fongiques résidant dans la cavité buccale humaine[10], sous forme de blastospores (*Candida albicans* est retrouvé dans 30% des cas sur une muqueuse saine), cellules rondes bourgeonnantes de plus ou moins 4 µm de diamètre [3, 141]. Cependant, en présence d'un déséquilibre de la flore microbienne (hygiène insuffisante, pH acide) ou d'un affaiblissement du système immunitaire, il se produit une multiplication des blastospores, en quantité plus importante [147, 209]. Ensuite, la levure développe sa forme pseudo-filamenteuse ou pseudomycélium, constituée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament ou mycélium vrai, spécifique de l'espèce *Candida albicans* (Fig n°3). Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte. Le passage par le stade de tubes

germinatifs, intermédiaires entre le blastopore et le mycélium, favorise la colonisation. La levure est alors capable d'adhérer et d'envahir les tissus (Fig n°4) [147, 209].

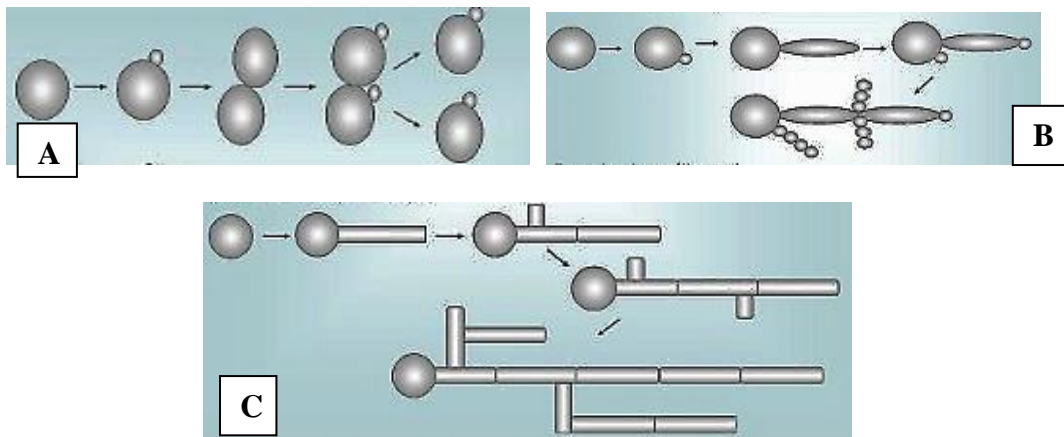


Figure n° 3 : Différentes formes de croissance des *Candida sp.*(Odds 1988) [125]
 (A)Formation des blastopores par bourgeonnement, (B) Formation de pseudo mycélium
 (C)Formation de mycélium.

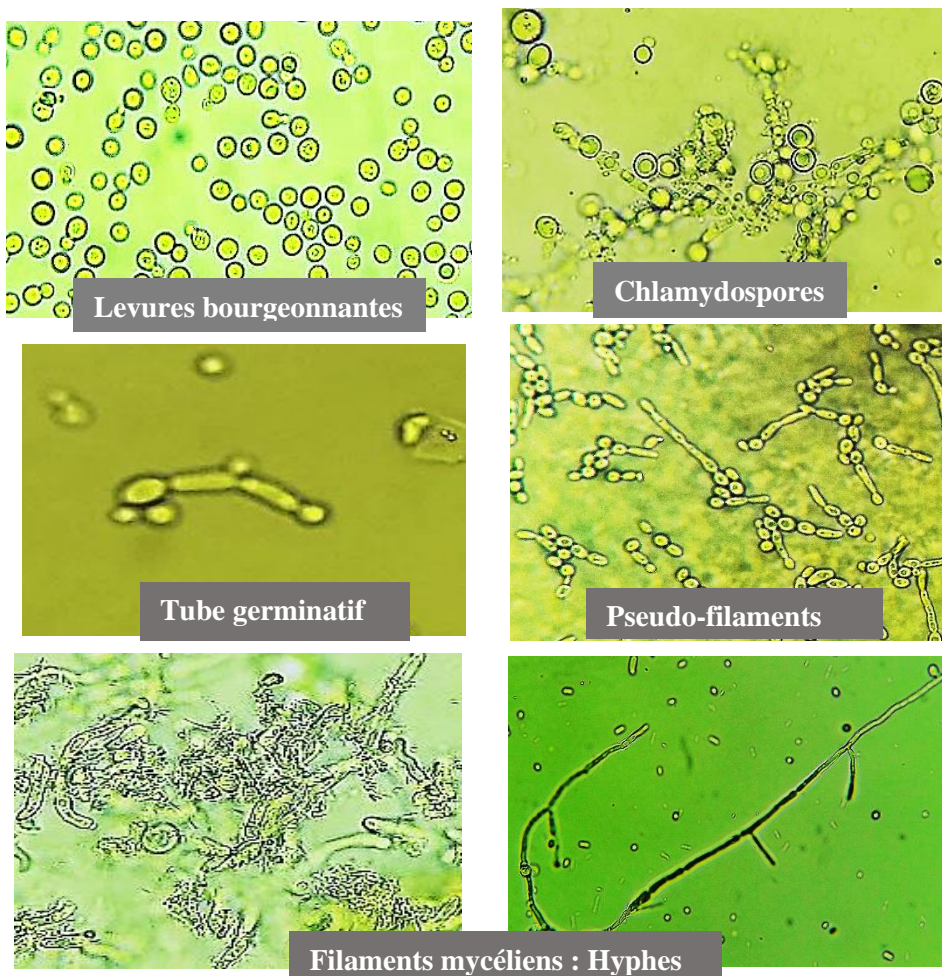


Figure n° 4: Observation microscopique des différentes morphologies du *Candida albicans* ($\times 400$) Laboratoire de Mycologie Médicale CHUT.

En plus des pathologies infectieuses superficielles, la colonisation et la formation de biofilms des surfaces buccales peuvent servir de réservoir d'infections disséminées, telles que la pneumonie par aspiration et l'infection gastro-intestinale[164]. Le *Candida* peut aussi engendrer des pathologies sévères comme la fongémie, précisément la candidémie pouvant aboutir à la mort chez l'immunodéprimé. [14, 129]Par ailleurs, ces microorganismes sont de plus en plus impliqués dans les infections nosocomiales aboutissant à un problème de santé publique (Fig n°5) [52].

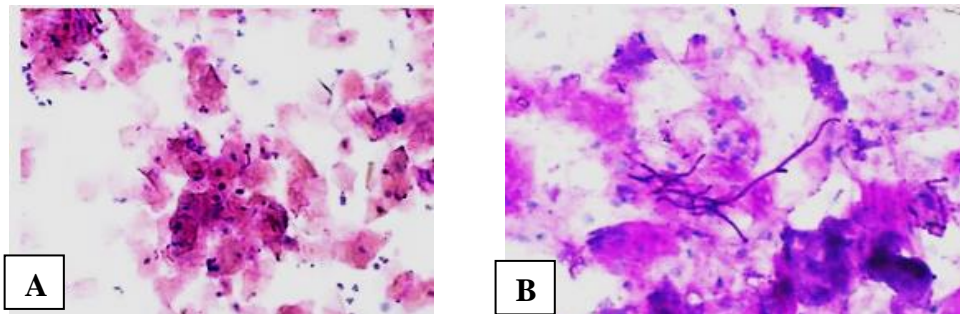


Figure n°5 : (A) Frottis contrôle de sujet sain ; frottis cytolologique buccal de la muqueuse palatine présentant des cellules malpighiennes typiques et des cellules inflammatoires chroniques dispersées (violet foncé)($\times 10$) , (B) Hyphes fongiques d'une stomatite prothétique ; frottis cytolologique buccal de la muqueuse palatine montrant une invasion tissulaire des hyphes de *Candida* ($\times 40$) [9].

Les *Candida* des biofilms se caractérisent par un phénotype distinct de celui exprimé en suspension et par une susceptibilité réduite aux antifongiques, suite à une augmentation des concentrations des nutriments avec une hétérogénéité microbienne et grâce à une communication intercellulaire et inter espèce[53, 147, 151].

Le *Candida albicans* est l'espèce la plus communément isolée des prothèses et du palais des patients atteints de SP (Fig n°6) [37, 86, 89, 105]de ce fait, elle est reconnue comme facteur étiologique majeur de la stomatite prothétique[95]. Même si diverses études ont isolé d'autres espèces de *Candida* des prothèses recouvrant des stomatites prothétiques, comme *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et surtout *C. glabrata* [57, 105, 177, 194]. Un nombre de 23 espèces de *Candida* a été diagnostiqué microbiologiquement en cinq ans chez des porteurs de prothèses amovibles complètes et partiels [131].

Un certain nombre de bactéries Gram négatif et positif comme le *Staphylococcus*, *Streptococcus*, et *Fusobacterium* peuvent également être impliquées [89, 95, 152, 178].

Les espèces *Candida* ont été regroupées selon leur virulence décroissante en trois groupes [14] :

- Groupes 1 : *C. albicans* et *C. tropicalis*

-Groupes 2 : *C. glabrata*, et *C. kefyr*

-Groupe 3 : *C. krusei*, et *C. parapsilosis*

Le *C.albicans* produit plus de biofilm avec une architecture plus complexe comparé aux autres espèces *Candida* (*glabrata*, *tropicalis* et *paraplosis*) moins de 10% des souches *albicans* en produisent contre 80% des souches *non albicans* [3].



Figure n° 6 : *Candida albicans* sur milieu Sabouraud- chloramphénicol isolé d'une prothèse amovible recouvrant une SP. Laboratoire de Mycologie Médicale CHUT.

□ Facteurs de virulence des *Candida*

Le genre *Candida* possède un ensemble de caractéristiques complexes assurant sa pathogénicité tels que : [40, 42, 147, 162, 164, 202, 211]

- Le dimorphisme
- La sécrétion d'adhésives servant à l'adhérence aux muqueuses.
- La production d'enzymes protéolytiques telles que les phospholipases et les aspartyl protéases.
- La régulation des pompes à efflux : par la H⁺ ATPase qui régule le pH intracellulaire offrant une acidification moyenne, impliqué dans l'induction du dimorphisme, dans la croissance des cellules fongiques et l'absorption de nutriments.
- Les molécules du quorum sensing (QS) ou détection du quorum sont des molécules de signalisation sécrétées par les cellules microbiennes qui permettent la perception de la densité cellulaire en modulant leur comportement communautaire. Ils sont responsables de la modification phénotypique, de la sécrétion des facteurs de virulence et de la formation des biofilms.
- En plus de la capacité à coloniser et à envahir l'ensemble des tissus, la capacité de croître rapidement à 37°C, et la possession d'une paroi cellulaire résistante aux enzymes de dégradation de l'hôte.

- **Dimorphisme**

Le dimorphisme est l'aptitude du *Candida* à modifier sa morphologie selon les conditions environnementales, à « switcher » de la forme levure bourgeonnante à la forme mycélienne vraie « hyphes ». Les principales formes pathogènes qui peuvent être observées sont la forme mycélienne et pseudo mycélienne, la forme commensale se présente comme des levures bourgeonnantes. En plus, la cellule fongique a la capacité de se présenter sous différents aspects visibles en microscopie optique.

- **Adhérence et la persistance du *Candida albicans***

Le *Candida* est capable de produire des adhésines en grandes les adhésines favorisant son adhérence à la surface des cellules hôtes par interactions spécifiques de type ligand-récepteur et réussir à coloniser les muqueuses .L'adhésion de *Candida* sur la muqueuse est conditionnée par des interactions qui impliquent des récepteurs cellulaires et des protéines de la paroi du *Candida* « adhésines »[202]. Ces exo polysaccharides constituent un facteur de virulence responsable de la dissémination de l'infection chez les organismes hôtes[52, 186].

- **Formation du Biofilm Prothétique**

Le *Candida albicans* peut adhérer et croître sur des surfaces abiotiques comme les prothèses dentaires nécessitant au préalable un dépôt d'une pellicule de protéines provenant de l'environnement salivaire, formant ainsi un biofilm à *Candida*[52, 186]la prothèse agirait comme un réservoir de micro-organismes, permettant au *Candida* de réinfecter continuellement la surface muqueuse contribuant au développement de la SP [47]Le *Candida albicans* dans un biofilm exprime une susceptibilité réduite aux agents antifongiques connus Fluconazole, Amphotéricine B, Nystatine, Chlorhexidine [53, 197].

- **Sécrétion des aspartyl -protéinases et des phospholipases**

Ces enzymes protéolytiques et lipolytiques contribuent à l'infection des muqueuses et aux infections systémiques, exprimés dans la phase d'adhésion aux cellules hôtes , de dimorphisme, et d'invasion tout en résistants aux défenses immunitaires[202]. Le *C. albicans* en biofilms produit plus de aspartyl -protéinases (Sap) qu'en suspension planctonique [151]. D'autres enzymes protéolytiques sont sécrétées par *C. albicans* comme les lipases et les phospholipases, qui ont la capacité d'hydrolyser une ou plusieurs liaisons ester des glycéro-phospholipides.

e) **Port continu de la prothèse amovible**

Le port prothétique continu (diurne et nocturne) a également été associée au développement de la SP [86]. Il permet au *Candida* de coloniser le biofilm sur la muqueuse et sous la prothèse. Un environnement relativement anaérobie est créé avec une diminution du pH, favorisant ainsi la prolifération opportuniste de levures pathogènes [95, 181]. Le port nocturne constitue un facteur de risque de la stomatite prothétique [76, 142, 226].

f) **Nature de la surface prothétique**

Il est à noter que la nature physico-chimique de la surface prothétique influe sur la formation du biofilm, en effet, les surfaces comme la résine polyméthacrylate favorisent cette formation [105].

Plusieurs facteurs influent sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Candida* sur les surfaces acryliques, comme la rugosité et l'hydrophobie et l'énergie de surface de la surface de l'intrados prothétique [129, 168, 194]. L'adhérence de *Candida* dépend de la microporosité présente sur la surface de la prothèse dentaire ; de telles irrégularités facilitent l'accroche des levures et rendent difficile l'élimination des microorganismes par les manœuvres d'hygiène [181].

L'intrados prothétique dispose d'une surface connue pour être rugueuse et hydrophobe ce qui joue un rôle dans l'apparition de la SP [95]. En effet, l'hydrophobicité a permis d'augmenter sélectivement la capacité des filaments du *C. albicans* à coloniser les surfaces des prothèses, des auteurs suggèrent d'utiliser des matériaux de revêtements hydrophiles afin de diminuer la capacité d'adhésion du germe [129, 177].

Le vieillissement du matériau a été aussi remis en cause, ceci favorise la colonisation par le *C. albicans* [218, 219].

g) **Salive et Acidose prothétique**

Une relation significative a été prouvée entre la présence de levures, l'hypo salivation et la diminution du pH salivaire [86].

Le rôle de la salive a été démontré par une dilution et une dispersion des microorganismes, grâce à la présence des molécules défensives et antimicrobiennes comme le lysozyme, la lactoferrine, la calprotectine, la sialoperoxydase, l'histatine (action antifongique contre *Candida albicans*) et l'IgA (anticorps spécifique anti-*Candida*) qui diminueraient l'adhésion du *Candida* aux surfaces buccales et interagissent avec la muqueuse buccale en prévenant l'envahissement des espèces *Candida* [89, 124, 202].

Des études plus récentes ont mis en évidence une diminution de la sécrétion salivaire au repos, mais aussi après stimulation chez le patient âgé de plus de 80 ans. Le vieillissement atteint surtout les glandes sous-maxillaires et sublinguales. Avec l'âge, on observe une atrophie progressive du parenchyme salivaire (cela dès 50 ans) [124].

Elle devient plus épaisse par augmentation du taux de mucines, moins riche en immunoglobulines et plus rare par diminution de la sécrétion de 40 à 50 % [124].

La perte des dents est aussi un facteur aggravant : les pathologies parodontales, les édentements non compensés par des prothèses orientent vers une alimentation molle, l'extéroception intervient à elle seule dans la physiologie salivaire en raison d'une capacité masticatoire réduite, conséquence d'une stimulation salivaire moins efficace « asialie partielle » [59, 189].

La sécrétion salivaire est directement affectée par des pathologies générales telles que le diabète, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde, la sarcoïdose, et les cancers orofaciaux [189].

La sécheresse buccale est aggravée par la prise régulière de certains médicaments (anxiolytiques, psychotropes, antihypertenseurs, bêtabloquants, diurétiques, antiarythmiques, antalgiques, antihistaminiques, anticholinergiques, agonistes dopamine, laxatifs) [124].

Le pouvoir tampon de la salive permet de réguler correctement le flux salivaire afin de participer au maintien d'un pH buccal environ de 7 [124].

Le port de prothèses amovibles s'accompagnent d'une réduction du pH buccal aboutissant à une acidification de la bouche « acidose prothétique », ce qui déséquilibre la flore commensale et favorise l'apparition de candidoses par multiplication des levures [124]. L'halitose et l'inconfort buccal (brûlure, picotement, sécheresse) sont les signes révélateurs de l'acidose prothétique [124].

Un pH de la muqueuse buccale inférieur à 6,5 est un facteur étiologique local prédominant qui contribue au développement de la SP [142].

-Patient denté pH = 6,83 [59]

-Patient édenté partiel pH = 6,6 [59]

-Patient édenté total appareillé pH = 6,23 [59] ; 6,41 [150] et 6,42 à 6,57 [152].

Pour d'autres auteurs, la moyenne du pH salivaire est de $5,8 \pm 0,5$ en présence d'une stomatite prothétique, contre un pH salivaire de $6,2 \pm 0,5$ chez un édenté complet sans stomatite prothétique [144].

Un faible pH environnemental favorise l'adhésion des levures, et induit l'activité enzymatique des protéinases qui constituent avec les lipases, des facteurs de virulence importants de *Candida* à cause de leur effets cytotoxique et cytolytique. Cette diminution de pH est contribué et maintenue par les produits métaboliques acides issue du métabolisme des glucides présents dans la salive, qui servent de source nutritive supplémentaire aux *Candida* [142].

1.1.2.2.Facteurs systémiques prédisposants à la stomatite prothétique

La SP peut être l'un des symptômes d'une maladie systémique dans laquelle la résistance à l'infection est réduite (Tableau n°II).

a. Sénilité

Le vieillissement est un processus physiologique inéluctable, lent, progressif, délétère et irréversible, qui aboutit à l'affaiblissement de l'organisme. Il est consécutif aux effets imbriqués de facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (habitudes alimentaires, environnement etc.). Même s'il n'est pas pathologique, il exacerbe les effets des maladies et leurs conséquences[189].

Le sujet âgé est défini à partir d'un critère d'âge de 65ans, on lui rapporte plusieurs altérations cellulaires, histologique et biologiques sur les muqueuses buccales [154, 189] :

- La multiplication cellulaire et la réparation cellulaire se trouvent amoindries.
- Un amincissement de l'épithélium, et une diminution de l'épaisseur des sous muqueuses.
- Une fragilité capillaire aboutissant dégénérescence du système circulatoire de surface (modification de la distribution des vaisseaux sanguins)
- Une disparition progressive des fibres collagènes et élastiques présentes dans le chorion et installation d'une fibrose diffuse (perte de l'élasticité)
- Une diminution des défenses immunitaires vis-à-vis des agressions extérieures (microbiologiques, thermiques ou traumatiques) et donc de la cicatrisation
- Une réduction de la sécrétion salivaire.

La prise en charge thérapeutique des patients âgés présente de nombreux problèmes du fait de la fragilité des patients, de leur participation aléatoire, des contraintes et risques des traitements. Il importe de ne jamais perdre de vue le risque de sous-médication (en attribuant à la vieillesse les symptômes d'une authentique pathologie) ou de surmédication [189].

Les personnes âgées atteintes d'une stomatite prothétique présentent une défense réduite contre le *Candida albicans*. Le vieillissement qui s'accompagne d'une régulation accrue de la réponse inflammatoire, et des altérations qualitatives et quantitatives du flux salivaire chez ces

patients, ont été démontré comme des facteurs prédisposants à la virulence des espèces *Candida*.

Une étude récente a évalué les taux des médiateurs antimicrobiens dans la salive des personnes âgées atteintes de stomatite prothétique, et les caractéristiques de l'activité des neutrophiles salivaires comparativement aux personnes âgées et aux jeunes sains.

Les personnes âgées présentaient une diminution des activités des enzymes antimicrobiennes salivaires (peroxydase et élastase), qui était plus marquée en présence de stomatite prothétique, et un taux des cytokines salivaire (IL-6 : interleukine 6 et CCL3 : interleukine 3) supérieur à ceux du groupe de contrôle jeunes, et cela était plus évident chez les sujets âgés avec stomatite prothétique. De plus, des pourcentages réduits de neutrophiles salivaires étaient détectés dans les deux groupes de personnes âgées.

Toutes ces perturbations d'immuno-sénescence pourrait être liée à une prédisposition aux infections orales et donc influencer sur l'installation et la persistance de la SP[90].

b. Ecosystème chez le sujet âgé édenté

L'écosystème buccal est un équilibre qui s'établit entre la prolifération microbienne, le flux salivaire et la réponse tissulaire, il participe à la protection du complexe buccal contre les pathologies inflammatoires et infectieuses courantes comme les candidoses.

Celui-ci est particulièrement fragile chez le patient âgé en raison des conditions physiopathologiques spécifiques : la diminution du flux salivaire, la présence de prothèses amovibles, la prédisposition aux pathologies locales (caries radiculaires, maladies parodontales et muqueuses, édentement) et les pathologies générales telles que le diabète, l'hypertension, la baisse des défenses immunitaires, la négligence de l'hygiène quotidienne ,et la réduction de la dextérité manuelle et parfois une perte partielle d'autonomie , qui vont déséquilibrer cet écosystème buccal, favoriser la formation du biofilm prothétique et fragiliser les tissus muqueux [124, 189].

La flore commensale se trouve moins riche (245 espèces bactériennes contre 500 espèces chez l'adulte). Chez le patient âgé sain, on retrouve des *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, peu de *Streptocoques mutans* , du *Candida* et pas de *lactobacilles*. Chez le sujet âgé, l'atteinte carieuse se situe au niveau radiculaire et l'augmentation des *Streptocoques mutans*, *Lactobacille* et *Actinomycès* a été mise en évidence dans de nombreuses études [124].

Le patient édenté non-appareillé dispose d'une flore discrète, puisqu'on constate chez l'édenté total une diminution de la quantité de potentiels pathogènes parodontaux et de *Streptococcus*

mutans[2], à l'inverse l'écosystème buccal d'un patient édenté appareillé comporte huit fois plus de germes anaérobies , et dix fois plus de germes aérobies , ce qui est en faveur d'une augmentation de la plaque microbienne[59].

c. Pathologies d'ordre générale

- **Diabète** : La salive des diabétiques favorise la croissance du *C. albicans in vitro* et il a été montré que le nombre de colonies fongiques est plus élevé dans la plaque prothétique des sujets diabétiques par rapport aux sujets non-diabétiques[89].
Le glucose salivaire est élevé chez les diabétiques et chez les patients sous antibiotiques et corticothérapie[180].
Les porteurs de prothèses ayant un apport nutritionnel élevé en sucre courent également un grand risque de SP [76], car le glucose stimule la croissance des espèces de *Candida* et augmente leur adhérence à la surface prothétique[144].
- **Néphropathie** : Ces affections sont fréquentes chez les individus âgés.
- **Immunodépression** : La déficience des neutrophiles
- **Carences nutritionnelles** : La prévalence était associée à une carence en fer, acide folique, vitamine A, B12, B9[76, 180].
- **Polymédication** : la survenue des candidoses orales peut être secondaire à une hyposialie rencontrée devant une large prescription de psychotropes, d'antibiotiques, corticoïdes, diurétiques, antihistaminiques, antidépresseurs, anti arythmiques, antiparkinsoniens[180].

d. Tabac

Le tabagisme est un facteur de risque systémique de la SP, les fumeurs ont montré une présence de *Candida* à des taux élevés. En plus il semble que les hydrocarbures aromatiques présents dans la fumée agissent en tant que nutriments pour la croissance et la prolifération des levures, et provoquent des altérations épithéliales localisées facilitant ainsi l'infection fongique[1, 76, 181].

Tableau n° II : Récapitulatif des facteurs de risque locaux et systémiques de la stomatite prothétique

Facteurs de risques locaux	Facteurs de risques systémiques
Hygiène bucco prothétique insuffisante	Diabète
Trauma prothétique	Immuno dépression
Port prothétique continu	Tabagisme
Conservation prothétique humide	Xérostomie
Réduction de la salive → ↓ pH	Radiothérapie
	Diète riche en hydrocarbonate
	Déficiência nutritionnelle
	Médication : Antibiotique, Antidépresseur, Anti arythmique, Corticoïde.

Source : adapté de Pruyer et al. 2016)

1.1.3. Mécanisme de défense

De nombreux mécanismes de défenses immunitaires et non immunitaires tentent d'empêcher l'installation et la propagation de l'infection buccale. Les histatines salivaires inhibent les blastopores et la filamentation, d'autres protéines salivaires, le lysozyme et la lactoferrine, contribuent à diminuer la viabilité des levures bourgeonnantes[202].

Les cellules épithéliales des muqueuses sécrètent des peptides doués de propriétés anti-*Candida* pour diminuer l'adhérence et inhiber la filamentation. Les neutrophiles quant à elles phagocytent les levures qui envahissent les tissus. Le lysozyme contribue au contrôle de la microflore orale, en exprimant une activité catalytique des glycoprotéines composants de la paroi des germes. La peroxydase possède une action anti -biofilm en contrôlant la croissance du biofilm sur les surfaces buccales[202].

Des études in vitro ont montré que les systèmes peroxydases inhibent la croissance planctonique de *C. albicans* et réduisent le développement de biofilms de cette levure [3, 202].

L'hétérogénéité de la cavité buccale et des microenvironnements associés pourrait influencer les deux principales peroxydases défensives présentes dans la salive : les peroxydases salivaires (SPO) et la myéloperoxydase (MPO). Les deux enzymes dégradent le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en tant qu'oxydant pour produire des antimicrobiens utiles par réaction avec l'oxyde nitrique (NO) et les ions libres. De même, il a été démontré que l'activité de l'élastase (ELA) joue un rôle important dans la destruction des agents pathogènes[90].

Cependant, il est récemment démontré que les cellules épithéliales sont capables de déclencher une réponse immunitaire similaire à celle des cellules de la lignée myéloïde (la lignée des

globules blancs: monocytes (macrophages, cellules dendritiques, ostéoclastes) et les granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles)), jouant ainsi un rôle crucial dans la reconnaissance active des microbes , par conséquent, l'épithélium buccal est capable de sécréter une variété de molécules effectrices de défense [221].

À l'origine, le rôle des cellules épithéliales dans ces événements était considéré comme relativement peu important, mais il devient de plus en plus évident qu'elles jouent un rôle clé dans le déclenchement de l'immunité muqueuse protectrice par la production de peptides antimicrobiens et l'interférence immunologique avec les cellules immunitaires locales. De même, l'élucidation d'un mécanisme épithélial de détection des hyphes et d'identification potentielle de *C. albicans* "pathogènes" a confirmé l'importance des cellules épithéliales dans la médiation des mécanismes muqueux protecteurs et dans la discrimination commensale pathogène[221].

1.1.4. Diagnostic et Classification de la stomatite prothétique

Le diagnostic est clinique, comprend une observation méticuleuse de la muqueuse palatine, basé sur la présence et l'aspect clinique de la surface d'érythème correspondante à la zone support de la prothèse[76, 173].

La stomatite prothétique a été classifiée par Newton en 1962 [95] basée exclusivement sur des critères cliniques au nombre de trois à caractère progressif :

- Type I : est caractérisé par une inflammation localisée simple ou une hyperémie aiguë (présences de pétéchies)
- Type II : le type le plus fréquent [178] , est présenté comme érythème diffus avec œdème de zones muqueuses palatines recouvertes par les prothèses dentaires.
- Type III : décrit une surface granulaire ou inflammation hyperplasique papillaire au palais central.

La lésion a été reclassée plus tard par **Budtz-Jorgensen-Bertram** 1975 [95]selon le type d'inflammation observée sur la muqueuse.

La classification Newton a été modifiée par **Barbeau** et al.2003 [20, 76], en fonction de la distribution de l'inflammation ainsi que du type, de l'intensité et de l'ampleur de la stomatite prothétique au niveau du palais (Fig n°7), celui-ci étant divisé en quatre quadrants par une ligne verticale sagittale médiane, et une ligne horizontale passant derrière les papilles bunoïdes (Tableau n°III).

Tableau n° III: Les différentes classifications de la stomatite prothétique [20].

Newton 1962 Signes cliniques	Budtz-Jorgensen et al. 1975 Caractéristiques de l'inflammation	Barbeau et al. 2003 Ampleur de l'inflammation		
		<i>Grade A</i>	<i>Grade B</i>	
Type I	Inflammation localisée	Simple inflammation localisée	1-2 quadrants touchés au maximum.	3-4 quadrants touchés.
Type II	Erythème généralisé couvrant la muqueuse support de la prothèse	Simple inflammation diffuse	Idem	Idem
Type III	Hyperplasie papillaire inflammatoire	Inflammation granulaire	Idem	Idem

Source : Barbeau, *Reassessing the presence of Candida albicans in denture-related stomatitis. Oral Surgery. 2003*

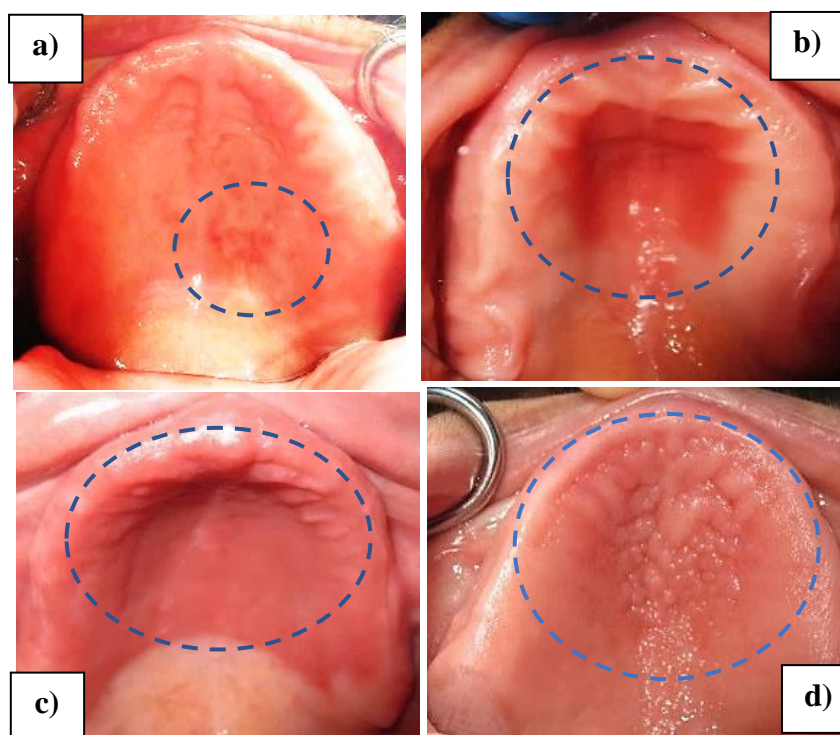


Figure n°7 : Les différentes formes cliniques de la stomatite prothétique selon la classification de Newton modifiée. Iconographie personnelle. Service de Prothèse Dentaire CHU Tlemcen
a) Stomatite prothétique type I (cercle bleu), **b)** Stomatite prothétique type II grade A (cercle bleu)
c) Stomatite prothétique type II grade B, **d)** Stomatite prothétique type III.

La recherche de micro-organisme n'est pas systématique, sauf en cas de non réponse au traitement[3].

En présence de maladie systémique, il y a lieu de pousser les investigations pour un prélèvement et culture, ou une biopsie devant une persistance de la lésion.

Un frottis gram-coloré du palais peut démontrer la présence des cellules filamenteuses de *Candida*, des prélèvements peuvent également être réalisés à partir de la surface de la prothèse[181].

La biopsie tissulaire n'est généralement pas justifiée sauf s'il existe d'autres caractéristiques suspectes de la lésion. Si une biopsie devait être effectuée, l'histologie peut montrer des réponses prolifératives ou dégénératives, avec atrophie épithéliale [3].

1.1.5. Gestion thérapeutique des stomatites prothétiques

Le traitement de la stomatite prothétique nécessite une approche globale et comprend plusieurs volets en raison de son étiologie complexe et multifactorielle.

Selon les nouvelles données, avant de prescrire un traitement médicamenteux, il faudrait éliminer les facteurs responsables de la stomatite prothétique en optimisant l'hygiène buccale et en ajustant les prothèses[76].

Le traitement de la stomatite prothétique (SP) devrait cibler les facteurs étiologiques et de risque discutés plus tôt « Page 6 », et un certain nombre de modalités thérapeutiques peuvent être nécessaires.

Selon d'autres auteurs, il est important de traiter tous les patients atteints de SP, même si la clinique est légère et asymptomatique, puisqu'elle est généralement de découverte fortuite, pour éviter qu'elle ne progresse vers la forme sévère de type III, où l'option chirurgicale sera probablement nécessaire[181].

1.1.5.1. Education thérapeutique des patients

Il est indispensable de commencer par une éducation thérapeutique des patients [181] :

- Instruction sur l'hygiène de la bouche et des prothèses amovibles.
- Retrait nocturne des prothèses amovibles.
- Equilibration d'une maladie chronique préexistante (exemple : diabète, immunodépression, pathologies neuropsychiques).

a. Amélioration de l'hygiène des prothèses amovibles

L'éducation des patients est une phase essentielle de la gestion des SP. Le patient devrait être capable de maintenir une hygiène bucco prothétique afin de réduire les populations des micro-organismes à la surface des prothèses[181].

Diverses méthodes de nettoyage efficaces des prothèses dentaires ont été préconisées, et les méthodes actives semblent avoir plus de succès que les passives. Parmi celles-ci, le brossage

des prothèses après chaque repas, en combinaison avec l'utilisation d'une pâte non abrasive ou une eau savonneuse. L'utilisation d'un bain sonore rempli d'une solution nettoyante permet de décrocher les cellules sessiles du biofilm prothétique [89].

Les méthodes passives de nettoyage des prothèses dentaires comprennent le trempage des prothèses dans des solutions antimicrobiennes et la désinfection aux micro-ondes.

La chlorhexidine est largement utilisée et présente de bonnes propriétés antibactériennes et antifongiques. Les prothèses acryliques trempées dans une solution à 2% inhibe l'adhérence et la croissance de *Candida* pendant une longue période comparée à l'amphotéricine B et la nystatine [181]. La solution d'hypochlorite de sodium est aussi utilisée pour tremper les prothèses dentaires, ce qui peut entraîner réduction de *Candida* et de la plaque. A raison de deux fois par jour pendant 15 minutes dans une solution à 0,02%. Ces méthodes de désinfection ne devraient être utilisées que pendant une courte période, car l'hypochlorite finira par décolorer la résine acrylique et la chlorhexidine aboutit à une coloration brunâtre de la résine[181, 219]. Les bains de bouche contenant de l'alcool et les antiseptiques utilisés quotidiennement assèchent et déséquilibrent la flore commensale [124].

La prescription d'un bain de bouche à base de bicarbonate de soude élève le pH salivaire et aide à maintenir l'écosystème buccal en contribuant à la réduction de la croissance des champignons[59, 124, 183].

La désinfection par micro-ondes des prothèses est une méthode de nettoyage sans danger pour les prothèses dentaires, permet la stérilisation complète des prothèses amovibles en utilisant 650W pendant 3 minutes [89, 181, 219].

b. Brossage du palais

L'utilisation d'une brosse à dents souple pour nettoyer le palais après chaque repas pendant une période de trois mois peut réduire l'inflammation palatine, et les patients qui n'appliquent pas ce mode sont près de quatre fois plus susceptibles rester en rémission de SP. Cela peut être dû au retrait du biofilm palatin, entraînant une augmentation de la kératinisation, une réduction de l'infiltration des cellules inflammatoires, et une prolifération accrue des fibroblastes et la synthèse du collagène. Le résultat global étant la formation d'une barrière mécanique à la colonisation microbienne[114].

Le brossage s'effectue en un mouvement de va et vient de gauche à droite et d'arrière vers l'avant pour environ 1 minute, après avoir assoupli les poils de la brosse sous l'eau chaude.

Ce nettoyage peut être complété par un massage de 15 à 20 minutes de pression croissante, stimulant la kératinisation et améliorant la qualité des tissus de soutien [66].

Il est conseillé de laver soigneusement les mains après la manipulation des prothèses. En effet, la présence de *Candida* a été détectée sur les doigts de 73% des patients porteurs d'une prothèse complète au maxillaire colonisée par *Candida albicans* [66].

c. Retrait prothétique nocturne

Le retrait nocturne est en faveur d'une amélioration de la stomatite prothétique[76]. Il est recommandé aux patients de retirer leurs prothèses pendant la nuit et de les garder au sec, car les microorganismes du biofilm ne résistent pas à la sécheresse prolongée[152, 181].

1.1.5.2. Traitement anti fongique

L'importance d'un traitement antifongique dans le traitement et la prévention de la stomatite prothétique a été confirmée, la stratégie thérapeutique comprend l'utilisation de médicaments antifongiques topiques et parfois systémique. Le traitement des stomatites prothétiques nécessite une approche globale, en débutant par la suppression des facteurs de risque responsables de cette lésion. Effectivement, les antifongiques ne devraient pas être employés seuls puisque différentes études ont montré que dans de tels cas, il y avait souvent une récurrence après la fin des traitements [220].

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de différents antifongiques, comme la nystatine et l'amphotéricine B ou le fluconazole, dans le traitement de la stomatite prothétique (Tableau n°IV). Pourtant, une récurrence des signes de la stomatite et une recolonisation par *Candida* ont été observées après l'arrêt du traitement. D'autre part, l'utilisation excessive d'antifongiques peut avoir des effets secondaires et entraîner une résistance des levures[76].

Une prescription des antifongiques est justifiée si il y aurait persistance de la SP malgré l'absence des facteurs responsables (hygiène bucco prothétique correcte, retrait nocturne ...) et si une candidose est confirmée par analyse mycologique [76, 105].

Les antifongiques locaux comme la nystatine en suspension, l'amphotéricine B suspension ou le miconazole gel buccal, doivent être gardés en contact du palais 2 à 3 minutes avant d'être avalés. La durée du traitement est de 3 semaines dans les formes chroniques. La perlèche est aussi traitée par gel antifongique appliqué sur les deux versants muqueux et cutané pendant 15 jours (Tableau n° IV)[24].

L'application topique de gel de Miconazole a l'avantage que le médicament soit maintenu au contact de la muqueuse affectée pendant une longue période de temps, et peut être appliqué même sur l'intrados prothétique pendant toute la nuit. L'utilisation d'agents antifongiques topiques devrait être utilisée conjointement avec une hygiène bucco prothétique satisfaisante pour espérer une guérison de la lésion sans récurrence [6, 10].

Chez l'immunodéprimé, le traitement local est d'abord tenté. En cas de mauvaise observance, d'échec du traitement local, de forme étendue, le fluconazole est prescrit à la posologie de 100 à 200 mg/j, en comprimé ou en solution, pendant 5 à 10 jours. En cas de candidoses réfractaires au fluconazole, l'itraconazole en solution est préconisé à 200 mg/jour [24].

Selon une étude récente, l'application des antifongiques sur l'intrados prothétique retentit sur l'état de surface : l'exposition du PMMA à la nystatine (100 000 unités/ml en suspension orale) peut induire des changements sur la rugosité et la mouillabilité, tandis que l'exposition au fluconazole (suspension 1%) peut affecter l'énergie libre de la surface et donc augmenter l'adhésion du *Candida* [5].

Les antimycosiques doivent être réservés au traitement des patients infectés : ils sont moins actifs contre les biofilms à *Candida sp* que sur les levures en suspension et ils pourraient provoquer l'apparition de souches résistantes s'ils sont appliqués tous les jours sur les prothèses dentaires pour prévenir la colonisation par les levures [177, 202].

La préparation à base de 24 ml de Mycostatine® ou de 40 ml de Fungizone® en suspension, de 90 ml d'Eludril® en solution et 1,4 % de quantité suffisante d'eau bicarbonatée est utilisée en tant que traitement topique des mycoses buccales [24].

Des prothèses dentaires antifongiques ont été mis au point et testées *in vitro* pour la prise en charge potentielle de la lésion. Les résines Poly Méthacrylique de Méthyl liaient des antifongiques cationiques comme le miconazole et le digluconate de chlorhexidine par des interactions ioniques. Les activités anticandidales du médicament contenu dans la résine ont été maintenues pendant une période prolongée sur plusieurs semaines. La libération du médicament peut être interrompue par rinçage spécifique et relancée par la recharge du médicament en fonction de l'état de la maladie afin d'améliorer l'efficacité et/ou de réduire le risque de résistance microbienne[43].

a. Mécanisme d'action des Antifongiques

La Nystatine et l'Amphotéricine B forment un complexe avec l'ergostérol (protéines membranaires de la cellule fongique) en augmentant la perméabilité membranaire ce qui aboutit à une altération de la membrane plasmique (Fig n°8) [23].

Les médicaments Azolés provoquent une inhibition de la synthèse de l'ergostérol, composant indispensable de la membrane cellulaire des micro-organismes, et de ce fait une altération de la membrane plasmique. Le mécanisme d'action du miconazole se situe à plusieurs niveaux : membranaire par augmentation de la perméabilité, cytoplasmique suite à une inhibition des processus oxydatifs au niveau des mitochondries et nucléaire par inhibition de la synthèse de l'ARN[24].

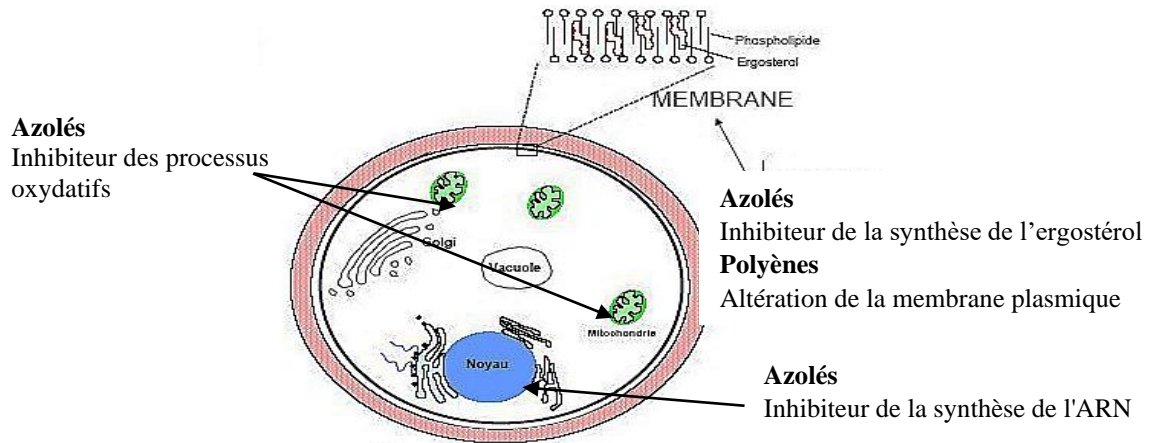


Figure n°8: Mécanisme d'action des antifongiques[23].

Tableau n°IV: Tableau résumant les différents produits pharmaceutiques indiqués dans le traitement des stomatites prothétiques[24, 173].

DCI	Nom commercial	Spectre	Mode d'action	Administration	Efficacité
Amphotéricine B	Fungizone® solution	Large + efficacité sur les biofilms à <i>C. albicans</i>	Biosynthèse de l'ergostérol par les membranes cellulaires du CA est bloquée, ceci altère leur perméabilité par inhibition.	3× jour application topique sur intrados des prothèses pdt 15 à 21 jours (5mn rinçage puis avalé)	Les solutions buvables restent inefficaces en raison du court contact avec la muqueuse buccale. Privilégier les pastilles.
	Nystatine® 100 000 unités / ml pastilles				
Clotrimazole	Canesten® Pastilles	Etroit Fongistatique Antistaphylococcique		3× jour pdt 15 jours	
Miconazole 2%	Daktarin® Miconazole®	Etroit (<i>C. albicans</i> , Gram+)	Inhiber la synthèse de l'ergostérol dans le réticulum endoplasmique de la cellule fongique	2 cuillères mesures 4× jour pdt 10 -15 jours Topique (sur prothèse aussi)	Supprime l'adhésion du <i>C. albicans</i> aux cellules épithéliales
Kétoconazole	Kétoderm® Crème 1%	Large Traitement de seconde intention			
Itraconazole	Sporanox®	Large		Topique et systémique	Effets secondaires rapportés
Fluconazole	Triflucan®	Large Pour les mycoses chez les séro positif VIH	Inhiber la synthèse de l'ergostérol dans le réticulum endoplasmique de la cellule fongique	Topique et systémique	Très efficace Plusieurs interactions médicamenteuses
Polyènes					
Azols : Imidazols de 1ère génération					
Triazols : Imidazoles 2^{ème} génération					

b. Résistance et récurrence

La toxicité et la résistance à ces médicaments antifongiques sont des problèmes auxquels des résultats variables ont été observés et où le taux de récurrence est élevé[47].

En effet, plusieurs études ont démontré l'inefficacité des antifongiques contre les différents biofilms fongiques. De multiples autres facteurs propres au biofilm contribuent à la résistance des levures aux médicaments antifongiques : la densité cellulaire, la détection du quorum-sensing, l'activité de la pompe d'efflux, la persistance des cellules, la présence de la matrice extracellulaire ECM, les réponses au stress et la surexpression des cibles médicamenteuses.

La densité cellulaire est un facteur important qui contribue à l'augmentation de la résistance des biofilms aux antifongiques. Cependant, certaines études montrent qu'il ne s'agit pas d'un mécanisme de résistance spécifique au biofilm parce qu'une tendance similaire a été observée pour les cellules planctoniques. **Pérumal** et al (2007) ont étudié l'efficacité de différents azolés, et de l'Amphotéricine B sur les cellules planctoniques à des densités similaires à celles trouvées dans les biofilms, et ont pu conclure que la susceptibilité des cellules dissociées du biofilm était similaire à celle des cellules planctoniques à la même densité cellulaire, et cette susceptibilité diminuait au fur et à mesure que la densité des cellules augmentait [200] .

La formation de biofilms, la surproduction ou la modification de la cible cellulaire de l'antifongique, et la surproduction des pompes d'efflux semblent être les mécanismes qui permettent à *C. albicans* d'échapper à l'action du fluconazole [46, 74].

Les antimycosiques doivent être réservés au traitement des patients infectés : ils sont moins actifs contre les biofilms à *Candida sp.* que sur les levures en suspension et ils pourraient provoquer l'apparition de souches résistantes s'ils sont appliqués tous les jours sur les prothèses dentaires pour prévenir la colonisation par les levures[202].

Etant donné que les agents antifongiques ont des effets secondaires en ce qui concerne leur toxicité, le développement de la résistance fongique, le manque d'une efficacité fongicide, les interactions médicamenteuses et le coût, l'alternative à l'utilisation des huiles essentielles des plantes aromatiques est une nouvelle tendance dans le traitement de la stomatite prothétique[177].

Néanmoins, les champignons ont développé une résistance tels que la surexpression des protéines de la pompe de flux, la formation d'un biofilm, et les altérations de la composition de la paroi cellulaire, en soulignant l'importance de comprendre ces mécanismes. Pour remédier à ces problèmes les différentes approches de prévention et de traitement des maladies fongiques devrait être prises en compte[200].

1.1.5.3. Traitement prothétique

a. Traitement pré prothétique

□ Mise en condition tissulaire

Les muqueuses doivent être assainies avant l'étape de l'empreinte définitive afin d'obtenir une bonne adaptation entre la nouvelle prothèse et la muqueuse buccale, les résines de conditionnement peuvent servir à corriger temporairement les imperfections et à réduire les érythèmes [76].

La mise en condition des prothèses avec des conditionneurs de tissus mous en adjonction avec des agents antifongiques comme la nystatine qui a rapporté des bénéfices thérapeutiques pour réduire l'adhérence de *Candida albicans*. [89, 181].

□ Rebasage ou renouvellement des prothèses

La réfection ou la réadaptation prothétique peuvent être envisagées pour rétablir la mastication et optimiser la stimulation salivaire [124].

L'amélioration de l'adaptation des prothèses instables est nécessaire afin d'éliminer le traumatisme tissulaire dû à la prothèse. Les matériaux conditionneurs employés pour la mise en condition tissulaire peuvent améliorer temporairement l'ajustement et la stabilité des prothèses dentaires, et ainsi réduire l'inflammation de la muqueuse.

L'association de ces procédures à l'application topique d'antifongiques sur les zones touchées et sur les prothèses est également pertinente [47].

Si une nouvelle prothèse est prescrite, l'élimination de l'inflammation tissulaire doit être obtenue avant que de nouvelles empreintes ne soient enregistrées. Le changement de la prothèse était efficace pour améliorer la stomatite prothétique, surtout pour la stomatite de type I [76].

b. Traitement prothétique

A cette phase du traitement prothétique proprement dit, les étapes de conception devraient avoir pour objectif l'enregistrement anatomo-physiologique des empreintes de travail en recherchant une rétention, une stabilisation et une sustentation maximale, sans compression de la fibro-muqueuse, avec un enregistrement adéquat des relations intermaxillaire afin d'établir une occlusion équilibrée. La réalisation correcte des prothèses au laboratoire passe aussi par un respect du rapport polymère/monomère, et une polymérisation des résines selon un cycle de cuisson progressif, en évitant toute trace de porosités qui ne feraient qu'enrichir la mise en place du biofilm prothétique (cf. Chapitre VI « Recommandations thérapeutiques »)

c. Traitement post prothétique

Les soins post-insertion préventifs contre l'apparition de la stomatite prothétique où contre sa récurrence, jouent un rôle vital dans le maintien de la santé physiologique de la cavité buccale. Il faut prendre les mesures nécessaires afin de maintenir un palais sain sans inflammation et éviter la formation d'un biofilm prothétique en réduisant l'adhérence du *Candida albicans*[181].

Cette approche compte essentiellement sur l'éducation thérapeutique des patients en leur inculquant les mesures hygiène bucco prothétique par un brossage des prothèses, du palais et l'utilisation d'agents désinfectants, et par un retrait nocturne des prothèses pour favoriser la détersion salivaire, tout en les conservant au sec à l'abri de l'humidité (Tableau n° V).

Tableau n° V:Gestion thérapeutique des stomatites prothétiques[181]

Chapitres	Consignes thérapeutiques
Améliorer l'adaptation des prothèses mal ajustées	<ul style="list-style-type: none">- Polissage des zones prothétiques rugueuses- Utilisation de matériau de mise en condition tissulaire.- Rebasage de l'intrados prothétique- Conception d'une nouvelle prothèse- Amélioration du brossage des prothèses- Suppression du port nocturne et conservation au sec.
Améliorer l'hygiène bucco prothétique	<ul style="list-style-type: none">- Brossage du palais dur.- Utilisation d'un bain sonique.- Trempage des prothèses dans une solution désinfectante- Désinfection par micro-ondes- Utilisation d'un bain de bouche au bicarbonate de soude
Utilisation d'antifongiques topiques et systémiques	<ul style="list-style-type: none">- Gel oral Miconazole- Suspension orale de Nystatine
Prise en charge spécifique de la pathologie systémique	<ul style="list-style-type: none">- Conseil sur le sevrage tabagique- Conseils diététiques- Substituts salivaires

Source : adapté de Pruyer 2016

1.2. Généralités sur les huiles essentielles et leur utilisation en phytothérapie

Les huiles essentielles appelées aussi « essences végétales » sont des métabolites secondaires, isolés des plantes par différents modes d'extraction : hydrodistillation, distillation à la vapeur, ou l'expression [8] constituées de composés aromatiques volatils de consistance huileuse, leur volatilité les oppose aux huiles fixes qui sont de structure lipidique ; dotées de caractères hydrophobes, et solubles dans les solvants organiques et les huiles végétales [19].

Ces essences végétales sont responsables des propriétés odorantes et biologiques des plantes aromatiques et médicinales, tels que les épices et les herbes aromatiques, très utilisée dans la médecine populaire, l'aromatisation et la conservation des aliments, ainsi que dans l'industrie des parfums [115].

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes pouvant contenir de nombreux composés différents qui appartiennent à deux groupes : le groupe des terpènes et des terpénoïdes qui représentent la classe la plus importante et des composés aromatiques dérivés du phénylpropanoïdes. Les principaux constituants des huiles essentielles sont des mono- et sesquiterpènes, les glucides, alcools, les éthers, les aldéhydes et cétones [19, 35].

Les terpènes (dont la formule chimique est $:(C_5H_8)_n$) sont le plus grand groupe de substances naturelles, bio synthétiquement dérivé à partir des unités d'isoprène (Figure n°9) . Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpènes sont classés en : hémiterpènes (1 unité : C5), monoterpènes (2 unités : C10) et sesquiterpènes (3 unités : C15).

Un terpène qui possède un oxygène est un terpénoïde. Dans le cas des huiles, seuls sont rencontrés les terpénoïdes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas très élevée, principalement les mono et les sesquiterpénoïdes. Les monoterpénoïdes sont présents dans la quasi-totalité des HEs (environ 90%).

De récentes études [39] montrent qu'une huile essentielles pouvait contenir jusqu'à 100 molécules différentes, et que sa composition biochimique n'était jamais rigoureusement identique. En outre, il est impossible de reproduire au laboratoire cette complexité présente à l'état naturel, d'où le grand intérêt au recours à ces substances pour lutter contre les bactéries, les champignons ou les virus.

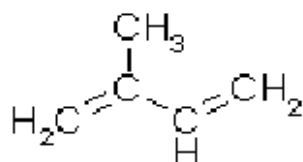


Figure n°9 : Structure de la molécule d'isoprène[33]

1.2.1. Activités biologiques des huiles essentielles

Diverses huiles essentielles produisent des effets pharmacologiques : anti-inflammatoire, antioxydant, et anticancérigène. Ces produits naturels sont dotés aussi de propriétés antimicrobiennes grâce à leurs constituants : propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et antiparasitaires[115, 162].

L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, les composés terpéniques et cétoniques). L'activité antimicrobienne décroît selon le type de la structure chimique :[32, 70, 84] Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité à large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools (α - terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et rarement les terpènes [70].

Les phénols possédant le pouvoir antimicrobien le plus élevé sont (par ordre décroissant) : le carvacrol, suivi du thymol, et enfin l'eugénol.[73]. Le carvacrol retrouvé majoritairement dans l'huile de Thym, caractérise cette dernière parmi les huiles les plus actives sur les microorganismes.

D'autres familles de composés présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes : certains alcools, aldéhydes et cétones monoterpéniques (géraniol, linalol, menthol, terpinéol, camphre, carvone, etc.), des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes [73].

Des résultats *in vitro* [39, 88] fournissent la preuve que les huiles essentielles représentent une source potentiellement riche pour la médecine et des conservateurs alimentaires contre les microorganismes. Par conséquent, les huiles essentielles utilisées seules ou en combinaison peuvent être utile comme anti-infectieux naturels.

On distingue deux effets des HE sur les levures : un effet fongicide (effet létal) ou un effet fongistatique (inhibiteur de la croissance des levures) [162].

Les auteurs montrent un certain intérêt aux traitements par les produits naturels, grâce à de nombreuses études *in vitro* qui ont prouvé une efficacité antimicrobienne non négligeable, ils se sont intéressés ensuite à la combinaison des huiles essentielles entre elles, et même d'une huile et d'un médicament antifongique, dans le but de répondre au problème soulevé par la résistance aux produits pharmaceutiques[162].

Les huiles essentielles qui présentent une bonne activité antibactérienne sont aussi de bons antifongiques [133]. On rapporte généralement que les champignons sont plus sensibles que les bactéries[63].

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques: thym, origan, lavande, menthe, romarin, cannelle, clou de girofle, sauge, etc... elles possèderaient les agents antimicrobiens les plus puissants[73].

Les plantes Thymus fontanesii (genre de Thym) et *Syzygium aromanticum* (genre de Girofle) apparaissent être des plantes riches en métabolites secondaires et largement utilisée en médecine traditionnelle pour combattre et guérir différents maux.

1.2.2. Plante aromatique de *Thymus fontanesii*

1.2.2.1. Données botaniques de la plante

Souvent assimilé au Thym, le genre *Thymus* est représenté en Algérie par 12 espèces. *Thymus fontanesii* décrit par *Boiss & Reuter* est une plante aromatique ,appartenant à la famille des labiées, espèce endémique du nord de l'Algérie et de la Tunisie [69].

En Algérie, il est connu sous le nom de *Zaâteur* par la population locale (Fig n°10) ; c'est une plante annuelle, spontanée [100], sous arbrisseau à tiges dressées et robustes, à feuilles oblongues-lancéolées de couleur vert foncée, entières et glabres, de 10 mm de long , à fleurs blanches ou pâles ,aperçues en mois de Mai et Juin (début de la floraison), très répandue dans les zones montagneuses (Tableau n°VI)[100, 149].

Retrouvée dans quelques stations isolées dans les régions de : Tlemcen[22], Djelfa[69], Sétif [96], Médéa [156], Bouira[149], Mostaganem [100], et Tiaret [157]. Elle pousse à des hauteurs qui oscillent du niveau de la mer jusqu'à 1800 m d'altitude dans un climat méditerranéen en zone semi-aride, commun dans le Tell.

Tableau n°VI: Caractéristiques botaniques de la plante aromatique *Thymus fontanesii*[149]

Ordre	Famille	Genre	Espèce	Nom vernaculaire commun	Répartition géographique
<u>Lamiales</u>	Lamiaceae (labiées)	<i>Thymus</i>	<i>fontanesii</i>	Thym, Zàateur, زعتر	Zones du littoral Zones semi- arides

Source : Mebarki, *Extraction de l'huile essentielle de Thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse anti microbienne*. 2010



Figure n° 10: Plante *Thymus fontanesii* (Zàateur) récoltée en province de Tlemcen. Laboratoire de Produits Naturels, Faculté de Biologie de Tlemcen.

1.2.2.2. Données phytochimiques de l'huile essentielle

Plusieurs travaux ont renseigné sur la composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) de la plante *Thymus fontanesii*.

L'huile essentielle de thym contient plusieurs composés chimiques terpéniques, phénolique et autres avec un composé majoritaire qui peut atteindre entre 60 et 70% [96, 156, 157] .

Les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* sont le carvacrol et le thymol, recueillis à des pourcentages qui différent selon le lieu et le climat [73].

En Algérie ,les deux compositions à prédominance carvacrol et à thymol sont retrouvées, mis en évidence grâce à une analyse chimique par chromatographie et spectrophotométrie[22, 69].

1.2.2.3. Données biologiques de l'huile essentielle

L'activité antimicrobienne de la majorité des huiles essentielles du *T.fontanesii* est aujourd'hui avérée, exerçant des effets antimicrobiens prometteurs contre la flore pathogène de la cavité orale [30] et suggèrent leur utilité dans la lutte contre le développement d'une croissance microbienne orale.

Très employé en médecine traditionnelle en raison de ses multiples effets thérapeutiques, le thym est utilisé en infusion, contre les infections respiratoires comme antigrippal, antitussif et contre les troubles digestifs[100].

L'HE du thym est riche en composés phénoliques dont le thymol et le carvacrol qui possèdent une forte activité antimicrobienne.

Le carvacrol est un monoterpénoïde, permettant l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol (composant des membranes des cellules fongiques), exprimant ainsi une puissante activité antifongique *in vitro*, contre les souches du *Candida* résistantes au fluconazole, le carvacrol paraît être actif contre *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*, [140, 162].

Le carvacrol est le plus actif de tous les composés monoterpéniques à savoir le thymol et l'eugénol, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire[32].

1.2.2.4. Chémotype de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Au sein de la même espèce de *Thymus fontanesii*, la composition de l'huile essentielle de divers échantillons de la plante peut présenter des types chimiques ou chémotypes différents, présentant des variations chimiques de leurs métabolites secondaires en fonction des conditions de l'écosystème (altitude, humidité, ensoleillement, biotope, etc.), bien que leur morphologie ainsi que leur génétique ne soient pas modifiée[15]. Par exemple, en climat chaud, la teneur en huile essentielle est plutôt élevée [73].

Ces différences ont lieu au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'huile essentielle qui peut être soit le Carvacrol ou le thymol, ce qui est à l'origine d'activités biologiques variables[15].

Selon la provenance de la plante, l'HE de thym peut être à chémotype Carvacrol (C₁₀H₁₄O) ou à chémotype Thymol (C₁₀H₁₄O) (spécificité biochimique contrôlée par CPG-SM) (Fig n°11). Tous deux des composés phénoliques mono terpéniques très actifs sur les microorganismes.

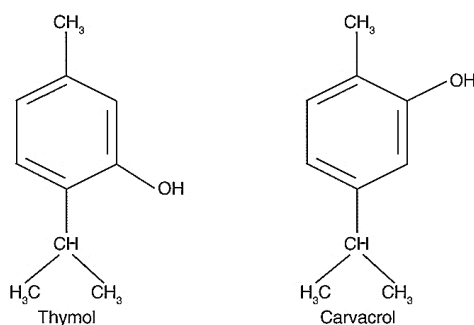


Figure n°11: Structures chimiques du Thymol et du Carvacrol , groupe des mono terpenoides[30]

1.2.3. Plante aromatique de *Syzygium aromaticum*

1.2.3.1. Données botaniques de la plante

Le clou de girofle (*Eugenia caryophyllata*) est largement cultivé à Madagascar, au Sri Lanka, en Indonésie et dans le sud de la Chine (Tableau n° VII)[98].

Le giroflier *Syzygium aromaticum* découvert par *Merrill & Perry*, est un arbre à feuillage persistant pouvant atteindre 12 à 15 cm. Les boutons floraux récoltés avant leur épanouissement, mises à sécher au soleil, donnent des clous de girofle renfermant une grande quantité d'essence. Celui-ci est représenté par une petite tige supportant une corolle aux pétales repliés sur le sommet, de teinte plus claire et facilement détachable (Fig n° 12) [187].

Tableau n° VII : Caractéristiques botaniques de *Syzygium aromaticum*

Ordre	Famille	Genre	Espèce	Nom vernaculaires	Origine géographique
Myrtales	Myrtacées	<i>Syzygium</i> <i>Eugenia</i>	<i>Aromanticum</i> <i>caryophyllata</i>	Girofle Korenfel, قرنفل	Indonésie Inde Madagascar



Figure n° 12: (A) *Syzygium aromaticum* à d'état frais (Royal Botanic Garden Edinburgh)
(B) Clou de girofle : bourgeons floraux séchés achetés chez un herboriste originaire d'Indonésie. Laboratoire « Produits naturels » Faculté de Biologie de Tlemcen.

1.2.3.2. Données phytochimiques de l'huile essentielle

Le clou de girofle renferme une quantité importante d'huile essentielle (HE), qui est connue pour être très riche en eugénol à 70 - 88%. Les autres principaux constituants de l'HE du girofle sont : acétate d'eugényl, et β -caryophyllène[17, 98, 214].

L'eugénol est un composé aromatique phénolique($C_{10}H_{12}O_2$) (Fig n°13), est un hydroxyphényl propène qui est un dérivé du phénylpropane C6-C3. Ces composés aromatiques sont beaucoup moins fréquents dans la composition chimique des huiles essentielles que les terpénoïdes. Un noyau aromatique est couplé à une chaîne de trois carbones. Les plus fréquemment trouvés sont les phénols (eugénol)et les dérivés de l'alcool cinnamique (aldéhydes, esters)[5].

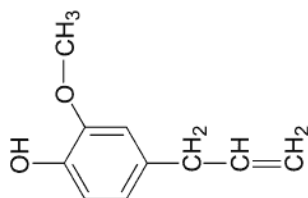


Figure n° 13 : Structure chimique de l'Eugénol[19]

1.2.3.3. Données biologiques de l'huile essentielle

L'huile du clou de girofle possède un large éventail des propriétés thérapeutiques, telles que l'activité antibactérienne, antifongique, antiseptique, antivirale, antioxydante, analgésique, anesthésique, anti-inflammatoire, insecticide, et très connue pour être anti-cariogène [177]. En effet, l'eugénol possède le plus remarquable potentiel anti-cariéux de tous les composés isolés des huiles essentielles (HEs) [138].

L'eugénol fut utilisé, pendant des milliers d'années, par voie topique en dentisterie en raison de son pouvoir analgésique, anti-inflammatoire, anesthésique et antimicrobien, comme composant d'un anesthésique local et d'un ciment dentaire temporaire, dans le but de soulager la douleur résultant de la pulpite et de l'hypersensibilité dentinaire[49, 177].

L'huile de clou de girofle est utilisée aussi traditionnellement comme agent aromatisant dans les aliments, et largement appliquée en cosmétique en tant qu'agent aromatisant [32, 113]

L'eugénol fait partie des composants phénoliques, (carvacrol, thymol) qui sont connus pour posséder des propriétés fongicides [136].

1.2.4. Mécanisme d'action fongitoxique des huiles essentielles

Les monoterpènes sont des substances hautement hydrophobes présentes dans les huiles essentielles (HEs). Ils couvrent un large spectre d'effets biologiques avec une interaction membranaire comme point commun, qui signifie interférer avec un important facteur de virulence de l'adhésion. En effet, les principales cibles des huiles essentielles sont la paroi et les membranes cellulaire et nucléaire. La principale action antifongique semble être exercée sur la membrane cellulaire [63, 136].

L'effet fongicide ou fongistatique des huiles essentielles sur les champignons filamenteux s'accompagne par des modifications morphologiques et une influence sur la morphogénèse hyphale, et une perturbation de la division cellulaire [31].

Les composés terpéniques des HEs et plus précisément leurs groupements fonctionnels, tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la couche de polysaccharides, acides gras et phospholipides qui composent la membrane plasmique [22, 51], déstabilisant l'intégrité cellulaire et favorisant la perméabilité cellulaire et notamment la fuite des ions potassium des protons par inhibition des pompes à efflux, il se produit une modification du pH de la cellule (acidification intracellulaire), ce qui provoquera un arrêt respiratoire de la cellule et donc la mort de la levure [63, 97, 209, 215].

Les polyphénols réduisent l'adhésion microbienne dans la cavité buccale. Ils agissent en dénaturant les protéines et la membrane cytoplasmique [24].

Les alcools agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation [70].

Les huiles sont d'excellents agents fongicides, y compris ceux résistant aux azolés, particulièrement contre le *C. albicans*, grâce à leurs composés (carvacrol, eugénol) qui peuvent inhiber les enzymes responsables de la synthèse de l'ergostérol composant indispensable de la membrane fongique, et freiner l'activité de la pompe à protons H⁺ ATPase de 70 à 90%, qui joue un rôle important dans la physiologie de la cellule fongique en soutenant le large gradient de proton électrochimique transmembranaire nécessaire à l'absorption des nutriments [162, 209, 215].

L'eugénol a démontré son habilité à interférer avec la morphologie de la membrane plasmique du *C. albicans*, et la transition morphologique vers la forme hyphale, réduisant ainsi la capacité du champignon à coloniser les tissus hôtes [34].

Le carvacrol présente un effet inhibiteur *in vitro* sur la formation du tube germinatif du *Candida albicans* [136] et un effet antifongique *in vivo* dans le traitement des candidoses systémiques chez la souris [170].

Certains composants des huiles essentielles comme la α -pinène, limonène, linalool et terpinène-4-o possèdent un effet inhibiteur du quorum sensing et ont provoqué une perméabilisation rapide de la membrane de *C. albicans*. d'autres huiles et leurs composants peuvent également inhiber l'expression de certaines enzymes considérées comme des éléments clés dans le catabolisme des glucides [162, 202].

1.2.5. Effet combinatoire des huiles essentielles, et des huiles avec des agents antifongiques médicamenteux

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est conditionnée par l'effet de leurs composants, pourtant des études ont montré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles entière est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément, ce qui suggère que les composants mineurs sont essentiels à l'activité et qu'ils peuvent avoir un effet synergique ou amplificateur de l'activité[19, 70, 126, 136, 170]. Les composés purs, le thymol et le carvacrol ont un effet synergique confirmé, ce qui expliquerait les différentes activités des chémotypes de l'huile du Thym [115, 126].

Comme pour les associations d'antibiotiques, les effets antimicrobiens des associations des huiles essentielles, sont définis selon quatre interactions possibles : **Indifférence**, **Addition**, **Synergie** ou **Antagonisme** [199].

Le synergisme entre les huiles essentielles et les antifongiques a été rapporté dans plusieurs articles. C'est une interaction positive créée quand l'association des deux agents, provoquent un effet inhibiteur supérieur à la somme de leurs effets individuels. En effet les huiles essentielles peuvent sensibiliser le microbe pathogène à un médicament précédemment inefficace [4].

Des combinaisons entre huile essentielle et agent antifongique avaient l'avantage de réduire la CMI de l'Amphotéricine B laissant espérer une baisse des effets secondaires[97].

Les principaux composants chimiques de l'huile de thym, ont montré un effet antifongique synergique avec le fluconazole antimycosique azolé en inhibant la surexpression des gènes de pompe à efflux[162].

Il a été observé que des associations d'H.E. de cannelle et de thym sont synergiques vis-à-vis certains micro-organismes [170].

Certaines combinaisons des deux molécules eugénol et thymol, ont conduit à un effet synergique, ce qui est intéressant dans la perspective de potentialiser l'inhibition d'une colonisation par *C. albicans* empêchant l'infection [34].

Les deux principaux composants structurellement similaires des huiles essentielles des *Thymus* : carvacrol et thymol, ont montré un effet additif lorsqu'ils ont été testés contre des microorganismes résistants. Le carvacrol et le para-cymène ont montré également un effet synergique [170]. Un effet synergique du mélange des huiles de girofle et de romarin a été observé pour le *C. albicans* [88].

Une autre étude a fait état de l'activité antimicrobienne des principaux constituants des huiles essentielles comme le thymol, carvacrol, cinnamaldéhyde et eugénol seuls ou combinés sur les levures buccales. Certaines combinaisons ont révélé un effet synergique : comme l'eugénol et le thymol, l'eugénol et le carvacrol, et du thymol et du carvacrol, durant le traitement des maladies infectieuses [121].

1.2.6. Activité antifongique in vitro et in vivo du Carvacrol et de l'Eugénol contre le *Candida albicans* dans le traitement de la stomatite prothétique

Les produits naturels se sont avérés être une alternative aux substances chimiques synthétiques et l'intérêt pour les plantes médicinales comme source d'agents antimicrobiens s'est considérablement développé. Une grande variété d'extraits de plantes aurait une activité antifongique contre le *C. albicans*. De ce fait, ces plantes médicinales peuvent jouer un rôle très important dans le traitement de la stomatite prothétique puisque la majorité de leurs huiles seraient fongitoxiques contre le *C. albicans* et pourraient être suggérées comme alternative prometteuse dans le traitement de ces lésions [47, 51, 68, 77, 123, 177].

Des études *in vivo* ont démontré une réduction de l'inflammation palatine chez des patients diagnostiqués avec une SP, grâce à une adjonction d'une huile essentielle dans un conditionneur tissulaire « Coe-Comfort » avec une activité *in vitro*, à la fois inhibitrice et fongicide sur le *C. albicans* [48].

Des résultats *in vitro* ont indiqué que le carvacrol et l'eugénol exerçaient tous les deux un effet inhibiteur anticandidal par un mécanisme impliquant un important dommage de l'enveloppe, et

que leur l'efficacité *in vivo* sur la candidose orale chez certains animaux (rats)[51]. Les huiles essentielles ayant comme composés phénoliques l'eugénol, et le carvacrol possèdent une forte activité contre le *C. albicans* [73, 118, 123, 140, 213]. L'huile essentielles de girofle a montré un effet inhibiteur potentiel sur les *Candida albicans* *C. glabrata* et *C. tropicalis*[121, 182].

Une autre étude *in vitro* plus récente démontre une activité antifongique de l'HE de Thym en plus d'une action anti biofilm à *Candida albicans*, et a suggéré de l'employer comme nettoyant pour prothèses dentaires[118].

En plus des études *in vivo*, il existe un bon nombre d'études *in vitro* examinant l'inhibition de l'adhérence des cellules du *C. albicans* à la surface des résines acryliques par des produits naturels permettant de les considérer comme de possibles agents antifongiques [162, 177].

1.2.7. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances très concentrées et peuvent provoquer des symptômes d'intoxication en cas de surdosage, résultant d'une toxicité connue depuis longtemps. Durant ces dernières décennies, la recherche s'est intéressait à leur mode d'action dans l'altération de l'organe comme le foie ou le système nerveux [62].

La toxicocinétique des huiles essentielles est difficile à établir, et peu étudiée pour constituer un dossier AMM « Autorisation de Mise en Marché ». Cependant de nombreuses études réalisées par plusieurs laboratoires, tentent d'éclaircir cette partie toxicologique tout en ayant des objectifs différents et des expérimentations très distinctes[62].

Des chercheurs ont effectué des essais de la toxicité de l'huile essentielles de *Thymus fontanaesii* réalisé chez la souris par gavage en doses uniques de 100 à 3 000 mg / kg, et ont conclu que le taux de mortalité ainsi que la toxicité de l'huile administrée par voie orale augmentaient avec des doses croissantes. Un traitement de 100 mg / kg n'a enregistré aucun signe clinique ni mortalité. Au-delà de cette dose, les souris présentaient des signes d'asthénie avec une importante anorexie, diarrhée et parfois des convulsions et leur mort était évidente à partir de 500 mg / kg (Dose létale qui tuait 50% des souris = 875 mg / kg) [206].

Une autre étude a démontré que les HEs de thym (*Thymus vulgaris* à chémotype thymol) et de clou de girofle avaient un effet cytotoxique *in vitro*, mais seulement à des concentrations très élevées sur des cellules pulmonaires embryonnaires humaines. L'effet d'un traitement de 24 heures avec une de ces HEs sur la viabilité de cellules dépendait de sa concentration,

puisque aucune augmentation significative du nombre d'ADN altérés par rapport à ceux des cellules contrôles non traitées n'a été rapporté. La cytotoxicité de l'huile de thym était aussi testée sur des hépatocytes de rat, sans que celle-ci n'induisse de dommage de l'ADN cellulaire [182].

Les critères d'une activité cytotoxique pour un échantillon brut établi par l'Institut National Américain du Cancer (USA), sont une CE_{50} « concentration efficace moyenne qui provoque environ 50% de la mort cellulaire » inférieure à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, et une intégrité de l'ADN cellulaire après exposition [182, 213]. Les huiles essentielles ayant une activité anti *Candida albicans* comme le *Thymus fontanesii* et *Thymus vulgaris* étaient considérées non cytotoxiques sur les cellules pulmonaires d'embryon humain et les cellules rénales du singe respectivement, exposé pendant 24 heures, puisque leurs CE_{50} étaient $> 30 \mu\text{g}/\text{mL}$ [182, 213].

Par conséquent, l'application des huiles essentielles dans le traitement des infections chez l'homme, suggérée par la médecine traditionnelle, peut constituer un moyen alternatif intéressant aux drogues synthétiques tout en les considérant comme sûrs pour l'homme à des concentrations relativement faibles, puisque les doses toxiques des huiles essentielles sont très élevées pour être employées en thérapeutique [182, 206].

1.3 Etat de la question

La prescription est un geste de pratique courante en médecine dentaire, elle concerne essentiellement les antibiotiques, anti-inflammatoires et les antalgiques, ces mêmes propriétés thérapeutiques appartiennent aussi aux extraits aromatiques de certaines plantes médicinales, plus connues comme huiles essentielles.

Aujourd'hui l'activité anti infectieuse de ces extraits contre les microorganismes pathogènes de la cavité buccale est reconnue et permet de compléter, voire de remplacer efficacement une médication chimique conventionnelle d'où l'intérêt d'inclure l'aromathérapie dans l'arsenal thérapeutique odonto-stomatologique.

Etant donné que la majorité de nos patients édentés complets sont déjà appareillés, et qu'en moyenne un tiers d'entre eux souffrent de lésions buccales en rapport avec le port prothétique, notamment la stomatite prothétique causée en grande partie par un agent infectieux le *Candida albicans*.

La prescription d'antifongiques est recommandée comme traitement médicamenteux de première intention : la Nystatine, le Miconazole, ou l'Amphotéricine B [181]. Cependant la plupart des études ont rapporté une récurrence de la lésion après arrêt du traitement, par conséquent, l'utilisation excessive ou continue d'antifongiques peut avoir des effets secondaires en entraînant une résistance des levures, et une détérioration de la surface du matériau des prothèses dentaires[5, 177].

Pour toutes ces raisons, certains auteurs se sont penchés vers la médecine à base de plantes aromatiques, où ils ont démontré leur efficacité à travers des études *in vitro* et *in vivo* [47, 203, 213] dans les traitements contre le *Candida albicans*. Des plantes médicinales ayant des composés majoritaires monoterpéniques (substances naturelles organiques, composé ayant un radical terpène, constituant odorant d'essence végétale) comme le carvacrol et l'eugénol représenteraient de puissants antifongiques, et leur effet combinatoire serait prometteur dans le traitement des stomatites prothétiques.

Les fortes activités antifongiques de telles huiles essentielles pourraient être d'une grande utilité dans le traitement et la prévention des candidoses buccales, sachant que ces huiles ont été

utilisées par différentes communautés en médecine traditionnelle [101]. Par ailleurs, leur forte action aromatique les rend irritants et dangereux à utiliser sous leur forme brute.

1.4 Problématique

Selon plusieurs études, le nombre de patients édentés totaux porteurs de prothèses amovibles complètes continue d'augmenter dans le monde, malgré l'évolution des techniques innovantes en dentisterie conservatrice et implantologie orale, et ce en raison du vieillissement de la population.

Il en résulte un traumatisme de la muqueuse support, une diminution du flux salivaire qui retentit sur le pH salivaire favorisant l'acidose prothétique, et une modification de l'écosystème buccal permettant un développement rapide du biofilm prothétique. Tous ces écueils sont en faveur à l'installation d'une stomatite prothétique, lésion courante due au port prothétique, causée majoritairement par un agent fongique le *Candida albicans*.

Cependant, les antifongiques dans ce cas sont plutôt efficaces, pourtant les chercheurs constatent une réapparition de la lésion dès l'arrêt du traitement, et une résistance des souches aux molécules.

A ce jour, l'utilisation de solutions à base de plantes médicinales rencontre un grand succès *in vitro*, sans aucune donnée clinique fiable, allant jusqu'à suggérer que les plantes médicinales et aromatiques représentent une source inexploitée de composés actifs possédant une activité anti-*Candida* qui peut être une ressource dans le développement de nouveaux produits thérapeutiques naturels, c'est ce qui a suscité notre intérêt pour la recherche d'autres substances fongitoxiques pouvant enrichir l'arsenal thérapeutique actuel, en étudiant la possibilité d'incorporation des huiles essentielles issues de plantes médicinales dans une préparation de base type gel buccal, pour évaluer et comparer son efficacité antifongique avec celle du Miconazole, le Gold Standard du traitement de la stomatite prothétique, et pour tester son innocuité biologique.

CHAPITRE 2 :

Matériels et Méthodes

2.1 Type d'étude

Il s'agit d'une *Etude Expérimentale* évaluant *in vitro*, l'efficacité antifongique de notre produit préparé à base d'huiles essentielles (de Thym et de Girofle) vis-à-vis des levures du genre *Candida albicans*, précédée par une *Etude Epidémiologique Descriptive* de la stomatite prothétique (SP) diagnostiquée chez les patients consultants au service de Prothèse Dentaire de Tlemcen.

2.2 Critères retenus

- La stomatite prothétique (SP)

Il s'agit d'une pathologie de la muqueuse orale liée au port de la prothèse dentaire amovible, de type inflammatoire affectant les tissus de revêtement recouverts par la prothèse dentaire.

Elle est détectée cliniquement selon trois types (classification Newton modifiée[20]) :

- Type I : inflammation localisée simple ou une hyperémie aiguë
- Type II : érythème diffus avec œdème de zones muqueuses palatines recouvertes par la prothèse dentaire.
- Type III : surface granulaire ou inflammation hyperplasique papillaire au palais.

-Grade A : Un à deux quadrants touchés au maximum (Fig n°14)

-Grade B : Trois à quatre quadrants touchés.

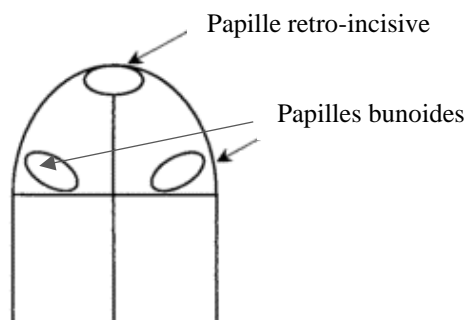


Figure n°14 : Diagramme diagnostique divisant la surface du palais en quadrants pour classer l'étendue de l'inflammation dans la sous-classe A (1-2 quadrants) et sous-classe B (3-4 quadrants) [20].

- L'efficacité antifongique

Un produit efficace est celui qui possède une activité destructrice contre les levures.

Dans notre étude, cette efficacité était matérialisée par l'absence de croissance des levures mises au contact des produits testés.

- La cytotoxicité d'un produit

La cytotoxicité est la propriété d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour les cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.

Dans notre étude cette cytotoxicité était représentée par la destruction et la mort des cellules orales humaines placées au contact des produits testés.

2.3 Objectifs

2.3.1 Objectif principal

- Comparer le caractère antifongique d'un gel buccal formulé à partir des huiles essentielles du Thym (*Thymus fontanesii*) et du Girofle (*Syzygium aromaticum*) contenant le carvacrol et l'eugénol *versus* celui du Miconazole sur le *Candida albicans* responsable des stomatites prothétiques.

2.3.2 Objectifs secondaires

- Déterminer *in vitro*, les concentrations minimales inhibitrices et fongicides des huiles essentielles
- Estimer la prévalence et la sévérité de la stomatite prothétique chez l'édenté complet.
- Etudier la cytotoxicité du gel buccal formulé à base de ces huiles.

2.4 Etude Epidémiologique

2.4.1 Population d'étude

▪ Critères d'inclusion

- Patients âgés de 40 à 80 ans, tous sexes confondus, édenté complet bi maxillaire, porteurs de prothèses dentaires et présentant une stomatite d'origine prothétique.

▪ Critères de non inclusion

- Patient édenté uni maxillaire ou partiellement.
- Patient édenté total non porteur de prothèse.
- Patient en cours de traitement antibiotique, antifongique ou corticoïdes local ou général le mois précédent l'étude.
- Patient souffrant d'une pathologie d'ordre général influant sur le milieu salivaire : diabète, immunodépression.
- Patient sous médication influant sur le milieu salivaire : chimiothérapie, antidépresseur.
- Patient présentant une candidose orale autre que la stomatite prothétique.

2.4.2 Lieu et durée de l'étude

L'étude épidémiologique a débuté en Septembre 2016 au service de Prothèse Dentaire à la clinique dentaire « B » CHU Tlemcen, pour étudier la prévalence de la lésion et effectuer des frottis des prothèses maxillaires, ensuite au service de Mycologie Médicale CHU Tlemcen pour l'identification des levures, l'étude s'est étalée sur deux ans et trois mois.

2.4.3 Déroulement de l'étude

2.4.3.1 Examen clinique et Prélèvement mycologique

L'étude a concerné un échantillon constitué de 78 patients édentés complets bi maxillaires appareillés, recrutés entre la période de Septembre 2016 jusqu'à Décembre 2018 au service de Prothèse Dentaire de Tlemcen.

Tout patient se présentant à la consultation générale lors des journées d'ouverture du service était enregistré et recruté dans l'étude s'il remplissait les critères d'inclusion, après avoir consenti d'y participer (Formulaire de consentement éclairé libellé en arabe et en français « Annexe 1 »).

Les observations cliniques étaient reportées, suite à un examen, sur un questionnaire d'évaluation qui renseignait sur les particularités des prothèses, les mesures d'hygiène et sur le degré de l'érythème de

la stomatite prothétique établit selon la classification des stomatites prothétiques de Newton modifié par Barbeau « Annexe 2 ».

Afin de justifier la nécessité de procéder à un prélèvement de l'intrados prothétique, nous avons dû expliquer aux patients l'état et la nature de leurs lésions puisque la stomatite prothétique est asymptomatique (non perçue par le patient), après leurs avoir présenté un consentement éclairé.

L'ensemble des patients ont reçu un traitement local par Miconazole gel buccal 2% novageneric® en application topique sur le palais et sur l'intrados prothétique à raison de trois fois par jour, pendant 21 jours (Fig n°15).

Un prélèvement mycologique des prothèses maxillaires était effectué au service de Prothèse Dentaire[16, 216] pour l'identification de l'agent microbien responsable de l'infection, et pour le recueil des souches cliniques pour l'étude expérimentale.

Le prélèvement était réalisé comme suit :

a. Etape 1 : Ecouvillonnage de l'intrados de la prothèse maxillaire

- Le patient sur le fauteuil dentaire retirait sa prothèse supérieure hors bouche.
- Un prélèvement de la plaque prothétique était réalisé par un triple écouvillonnage de l'intrados prothétique avec un écouvillon stérile (AFCO, Origin JORDAN) où son bord cotonneux était bien frotté contre la surface, en effectuant un mouvement d'un tour de 360° pour chaque zone (Fig n° 16 A).
- L'écouvillon était remis immédiatement dans son tube de transport au sec (Fig n° 16 B).



Figure n°15 : Miconazole 2% gel buccal, novageneric®. Iconographie personnelle. Service de Prothèse Dentaire Tlemcen.

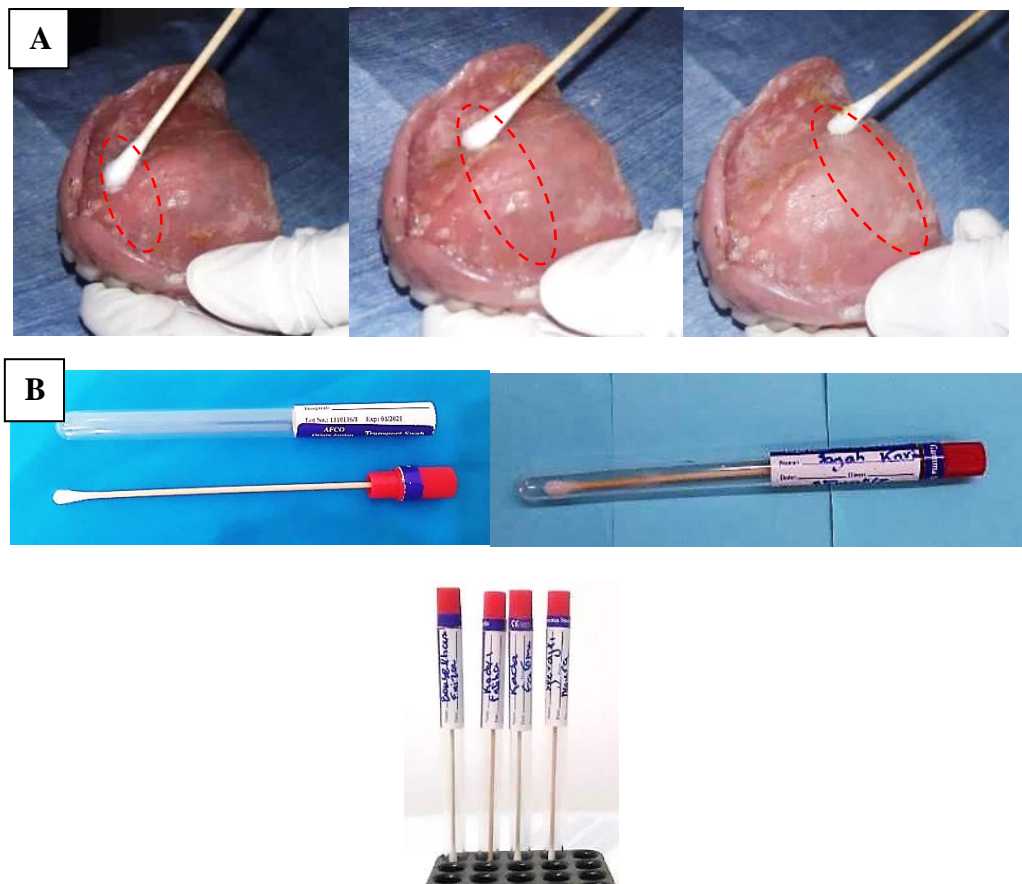


Figure n° 16 : (A) Site d'échantillonnage de l'intrados prothétique pour les examens mycologiques sur localisé sur trois zones différentes (ligne en pointillé) :zone antérieure , moyenne et postérieure du palais, (B) Ecouvillons dans leurs tubes de transport après prélèvements.
Iconographie personnelle- Laboratoire de Mycologie Médicale CHU Tlemcen

b. Etape 2 : Conservation et transport du prélèvement

- L'écouvillon était remis aussitôt dans son tube de conservation et de transport, comportant sur son étiquette les renseignements du patient et du prélèvement, pour être acheminé instantanément au laboratoire de Mycologie Médicale CHU Tlemcen et traités dans les 30 minutes suivant leur collecte, en raison de la multiplication rapide des levures, accompagné du questionnaire d'évaluation, et d'une fiche de diagnostic « Annexe 3 ».

2.4.3.2 Examen du Prélèvement au laboratoire de Mycologie

a. Etape 1 : Examen direct des levures sous microscope optique

- Une suspension était préparée pour chaque échantillon de frottis de l'intrados prothétique, en trempant l'écouvillon contaminé dans 1mL d'eau physiologique, pour être soumis à une vitesse rotatoire sur un appareil type Vortex (VIBROFIX VF1 ELECTRONIC®) à 1000 tours/min

pendant 30 secondes afin de décharger le contenu microbien et de maximiser l'homogénéité des suspensions (Fig n° 17 A).

- Une goutte de l'inoculum était déposée entre lame et lamelle (Fig n° 17 B), et observée à l'état frais sous microscope optique (Leica) à un grossissement $\times 10$, et à $\times 40$ (Fig n° 17 C).

L'examen direct était positif en présence de filaments mycéliens ou pseudo- filaments.

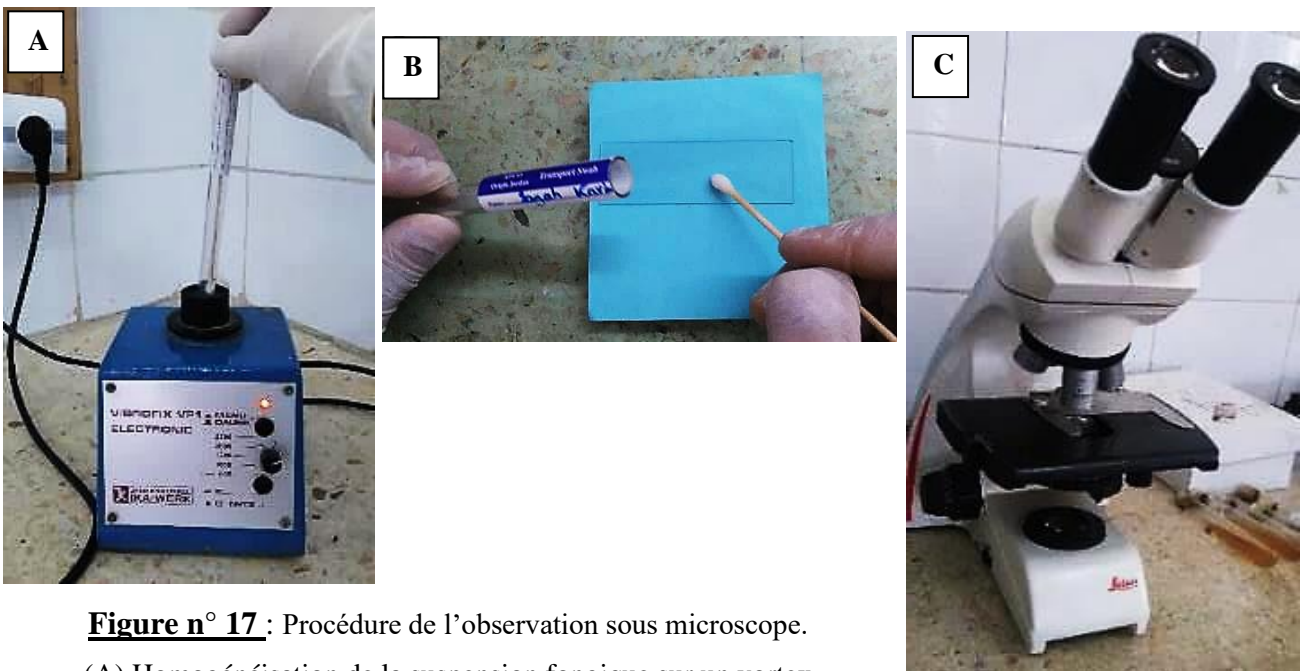


Figure n° 17 : Procédure de l'observation sous microscope.

- (A) Homogénéisation de la suspension fongique sur un vortex
- (B) Mise en place de l'inoculum entre lame et lamelle.
- (C) Observation sous microscope optique.

Iconographie personnelle - Laboratoire de Mycologie Médicale – CHU Tlemcen.

b. Etape 2 : Culture des levures sur milieu chromogène et pré identification des souches Candida

□ Culture des levures sur milieu chromogène

- 100 μ L de cette suspension était étalée sur milieu de culture chromogène pour levures HiCrome HIMEDIA™ « cf Annexe 4 » dans une boîte de Pétri jusqu'à épuisement de l'inoculum.
- La lecture des résultats s'effectuait après incubation dans une étuve pendant 48h à 37°C (Figure n°18).
- **La culture était déclarée positive, s'il y avait croissance de 10 colonies de levures et plus (≥ 10 colonies), qui était en faveur d'une infection candidosique. Le *Candida* étant un commensal de la bouche, il est possible de retrouver quelques colonies.**

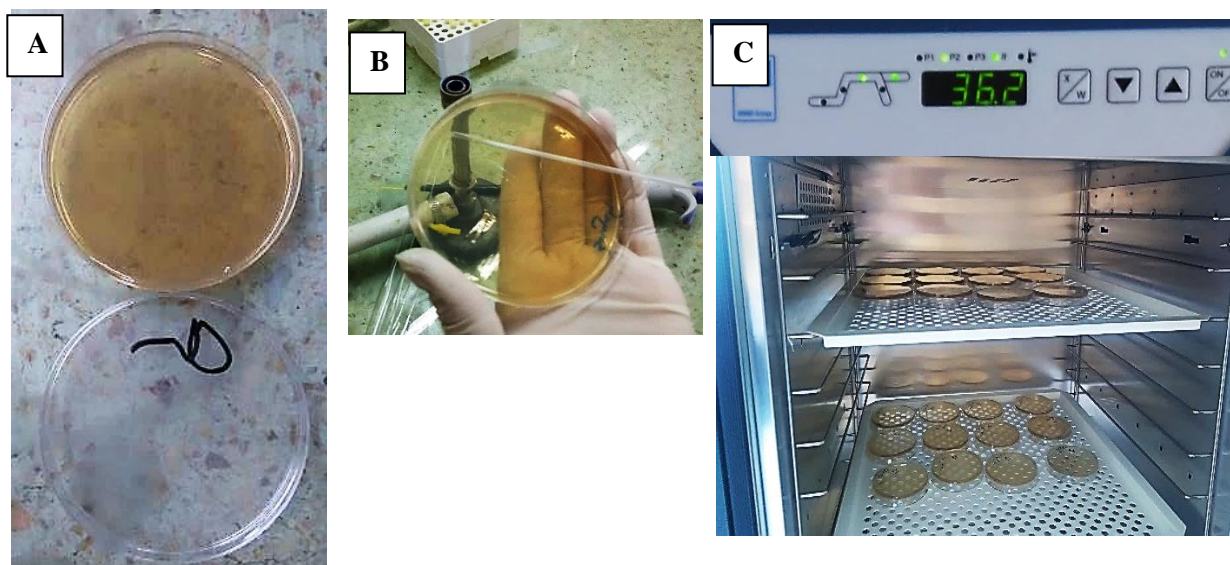


Figure n°18 : (A) Milieu chromogène coulé dans une boîte de Pétri.
 (B) Ensemencement de l'inoculum sur milieu chromogène à l'aide d'un râseau
 (C) Incubation des boîtes de Pétri ensemencées dans une étuve à 37°C pendant 48h.
 Iconographie personnelle - Laboratoire de Mycologie Médicale – CHU Tlemcen

Pour pouvoir déclarer l'existence d'une infection candidosique, l'interprétation de l'examen mycologique se devait de prendre en considération le résultat de l'examen direct sous microscope et celui de la culture sur boîte Pétri (cf. Tableau n° VIII). Un conflit pouvait exister en cas d'un examen direct négatif et d'une culture positive, pour les deux raisons suivantes :

- Si la forme de virulence du germe a échappé à la surface de l'observation microscopique sur lame, dans ce cas l'examen direct est déclaré être non sensible.
- S'il s'agit de l'espèce *Candida glabrata*, qui est caractérisée par une incapacité de filamentation et se présente uniquement sous la forme levurique.

Tableau n° VIII : Interprétation des résultats de l'examen direct sous microscope et de la culture des levures sur milieu Sabouraud.

Examen direct	Culture	Interprétation de L'examen mycologique
+	+	+
-	+	+
+	-	-
-	-	-

❑ Pré-identification des souches *Candida*

Le milieu chromogène est un milieu sélectif, qui repose sur la présence de plusieurs substrats chromogéniques « molécule avec colorant organique » permettant une coloration variée des colonies à la suite de leur dégradation par des enzymes spécifiques aux espèces (Figure n°19),

Les évaluations microbiologiques qualitatives ont tenté d'identifier certaines espèces *Candida* en enregistrant la couleur et les caractéristiques morphologiques des colonies (Tableau n°IX), ce qui constituait le principe de la pré-identification.

Donc ce milieu chromogène a permis :

- Un isolement sélectif des colonies de levures, indiquant la présence, grâce à leur couleur, d'une seule ou de plusieurs espèces *Candida* (Figure n°20).
 - Une identification directe du *Candida albicans*
 - Et une identification présomptive (orientation) de quelques autres espèces non-albicans
- **Le repérage des colonies vertes était suffisant pour identifier la souche *Candida albicans*.**

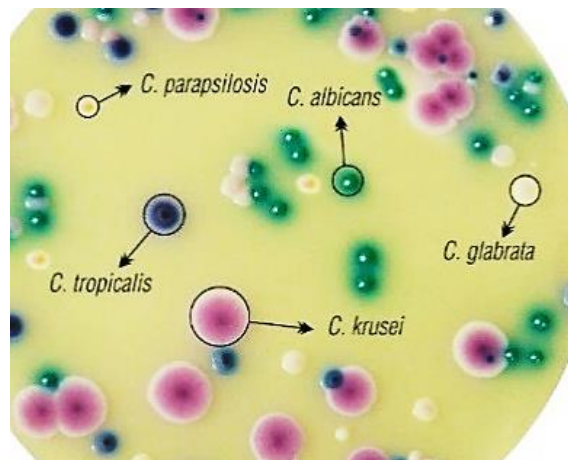


Figure n° 19 : Colorations obtenues des *Candida* sur le milieu chromogénique HiCrome™ [190]

Tableau n°IX : Représentation des espèces *Candida* sur milieu chromogène.

	Espèces <i>Candida</i>	Forme Tailles des colonies	Coloration
<i>Identification</i>	<i>C. albicans</i>	Rondes en relief à limites nettes, moyennes.	Verte turquoise
	<i>C. glabrata</i>	Rondes en relief à limites nettes, moyennes.	Crème à Blanche.
<i>Orientation</i>	<i>C. tropicalis</i>	Rondes en relief à limites claires, grandes	Bleu métallisé / Violet
	<i>C. krusei</i>	Floues, aplaties, moyennes.	Rose /Prune

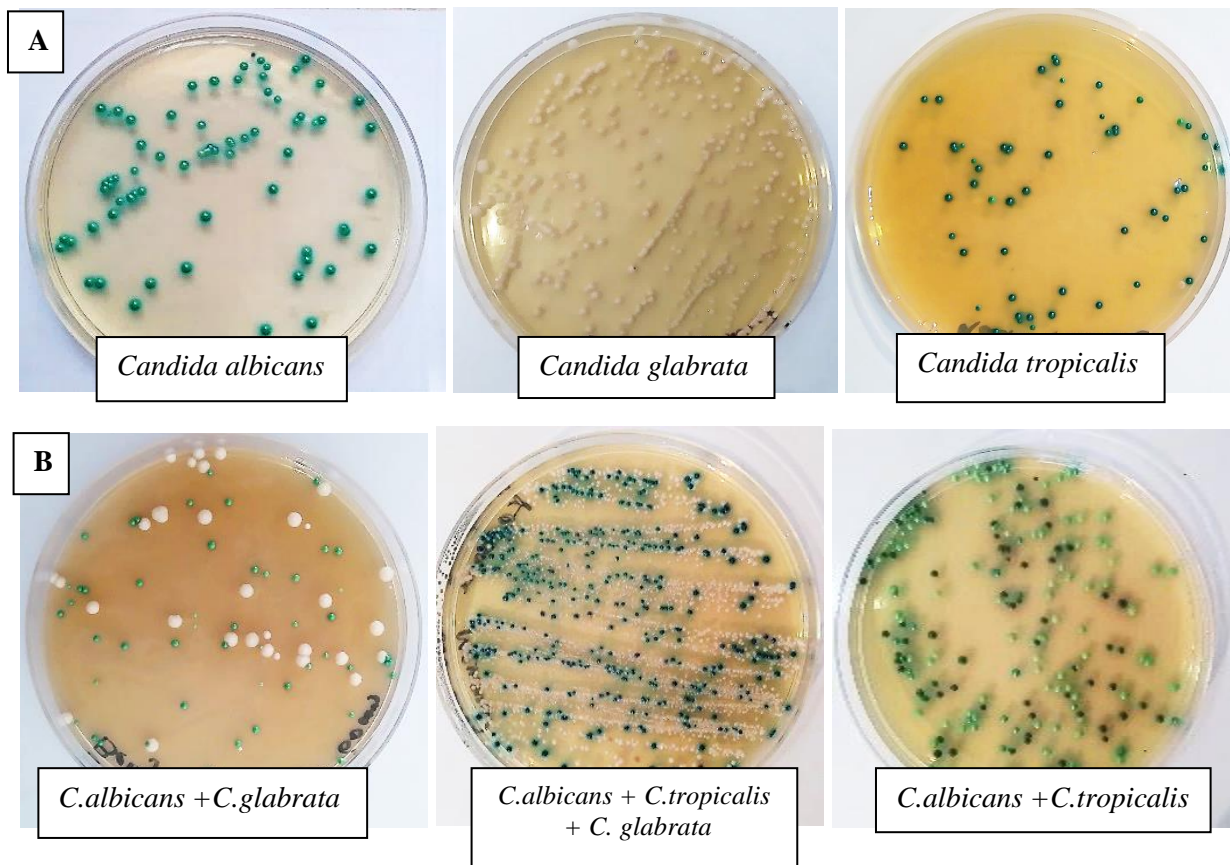


Figure n° 20 : Pré-identification des espèces *Candida* sur milieu chromogène :

(A) souches mono-espèce.

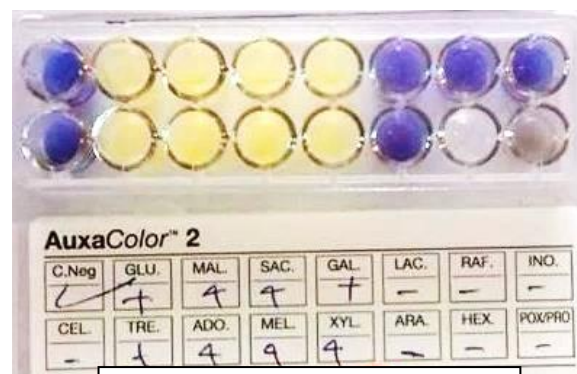
(B) souches pluri espèces : *Candida albicans* (verte), *Candida tropicalis* (bleu) et *Candida glabrata* (blanche). Iconographie personnelle - Laboratoire de Mycologie Médicale – CHU Tlemcen.

c. Etape 3 : Identification des souches Candida non-albicans par test complémentaire

- Une tentative d'identification de certaines espèces de *Candida* était déterminée par la couleur des colonies sur milieu chromogène, mais les identifications des espèces non-albicans étaient confirmées par une méthode conventionnelle grâce aux tests biochimiques.
- Des colonies distinctes étaient choisies pour chaque espèce. Celles-ci étaient repiquées sur gélose Sabouraud/ Chloramphénicol™ et incubées pendant 48 h à 37°C. Les morphotypes uniques étaient identifiés à l'aide d'un panel de tests biochimiques de la galerie AUXACOLOR 2™ conformément aux instructions du fabricant (BIO-RAD, Paris, France), qui permet l'étude des caractères biochimiques et métaboliques suite à une assimilation des sucres par les levures.
- Une suspension de chaque culture était préparée avec de l'eau physiologique, et amenée à une absorbance de 1,5 MacFarland sur un densitomètre (mesure de la turbidité de la suspension fongique)
- 100µL de l'inoculum était distribuée dans chaque puits de la galerie.
- Après incubation de 48h à 37°C, **la croissance des levures se traduit par le virage de l'indicateur du bleu au jaune et par l'apparition d'un trouble dans la cupule (Figure n°21)**
- **La lecture des résultats aboutit à l'obtention d'un code à cinq chiffres, dont la correspondance est représentée dans un tableau de références constituant la base de données des souches de levures « cf Annexe 5 ».**



A)- Avant inoculation des puits



B)- Après inoculation des puits

Figure n° 21: Galerie Auxacolor 2 « BIO-RADE » (A) avant et (B) après identification.
Iconographie personnelle - Laboratoire de Mycologie Médicale – CHU Tlemcen.

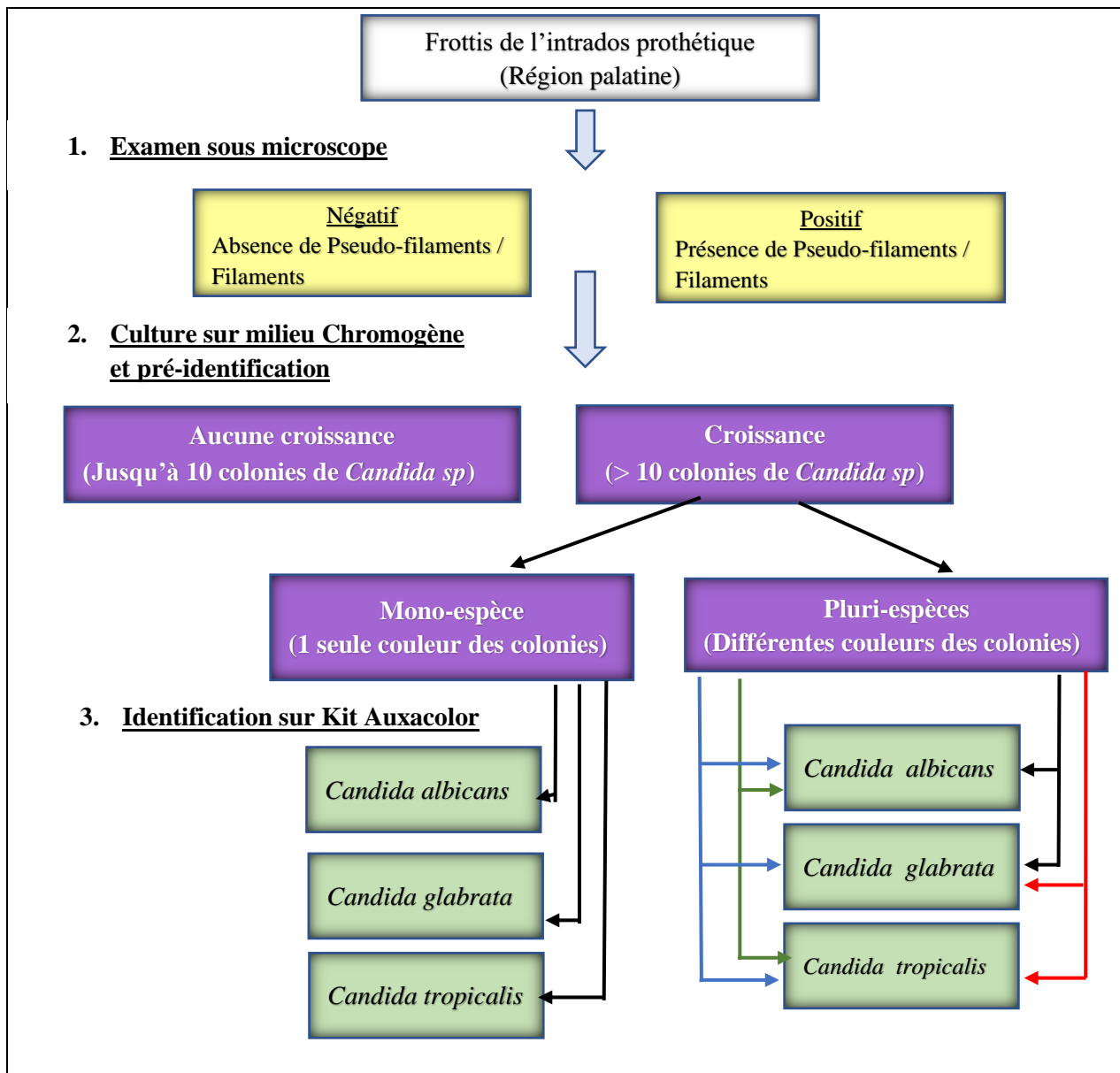


Figure n° 22 : Organigramme résumant les étapes de la procédure mycologique de notre étude.

d. Etape 4 : Conservation des souches *Candida albicans* pour la phase expérimentale

- Les souches cliniques isolées du *Candida albicans* étaient repiquées sur milieu de culture pour levures Sabouraud /Chloramphénicol « cf Annexe 4 » dans des tubes à essai (Figure n° 23).
- Après incubation de 48h à 37°C, la culture mettait en évidence des colonies de *C.albicans* bien rondes, blanchâtres et crémeuses. Les tubes à essais bien refermés, étaient conservés au frais à 4°C, afin d'utiliser les souches pour la phase expérimentale.



Figure n° 23 : Colonies de *Candida albicans* sur milieu de culture Sabouraud/ Chloramphénicol.
Iconographie personnelle - Laboratoire de Mycologie Médicale – CHU Tlemcen.

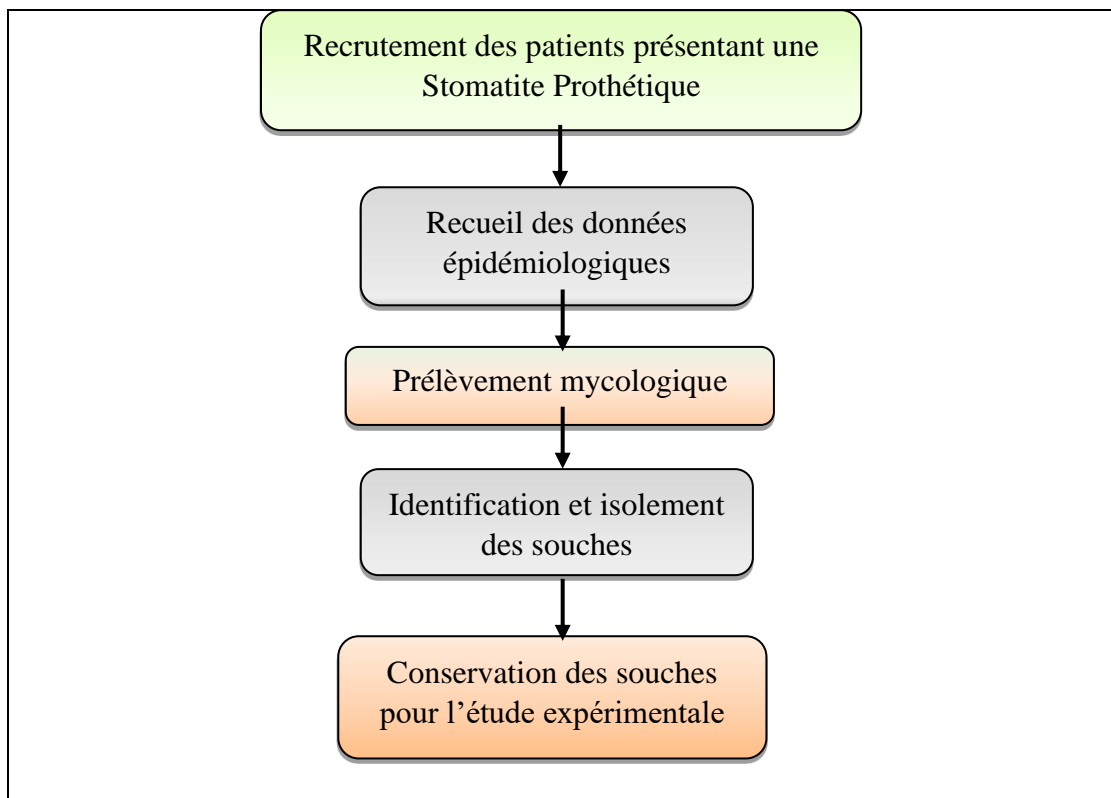


Figure n° 24 : Organigramme représentant le déroulement de l'étude épidémiologique.

2.5 Etude Expérimentale

2.5.1 Population d'étude

La population était constituée de :

- Cinq souches cliniques isolées de *Candida albicans* à partir des prothèses dentaires amovibles.
- Deux souches de références de *Candida albicans* ATCC 10231, et *Candida albicans* ATCC 26790.
- Six lignées de cellules fibroblastes gingivales humaines, cultivés à partir des explants de la cavité buccale.
- Deux échantillons de la muqueuse palatine humaine, prélevés chez des patients sains.

2.5.2 Lieu et durée de l'étude

L'étude expérimentale avait débuté d'abord au laboratoire de Produits naturels – Faculté de Biologie de Tlemcen, en Janvier 2018, en définissant la sensibilité des levures aux produits testés, puis de Mai 2018 à Juillet 2018 au laboratoire BIOS- Pôle Santé- Université de Reims Champagne Ardenne, en recherchant les concentrations efficaces et la cytotoxicité des produits étudiés.

2.5.3 Déroulement de l'étude

L'intérêt de ce travail était d'évaluer l'activité antifongique des huiles essentielles (HEs) extraites de plantes naturelles *Thymus fontanesii* et *Syzygium aromaticum*, en comparaison avec un médicament de référence : le Miconazole.

Le déroulement de l'étude expérimentale a comporté les parties suivantes :

*Etude *in vitro* de l'activité antifongique des huiles essentielles testées par :

- ✓ Une récolte des plantes aromatiques et une Extraction des huiles essentielles.
- ✓ Une étude de la composition chimique des HEs
- ✓ Une évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles et de leur combinaison.

*Etude comparative *in vitro* de l'efficacité d'un gel préparé à base des HEs étudiées, avec celle du Miconazole par :

- ✓ Une comparaison de l'activité antifongique
- ✓ Une comparaison de l'action anti-biofilm prothétique

*Etude *in vitro* et *ex vivo* de la toxicité du gel préparé par :

- ✓ Une évaluation qualitative suite à une appréciation de la morphologie cellulaire.
- ✓ Une évaluation quantitative suite à la mesure de :
 - La cytotoxicité
 - La viabilité cellulaire
 - La quantité d'ADN cellulaire

2.5.3.1 Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des huiles essentielles et de leur combinaison

a. Récolte des plantes aromatiques et extraction des huiles essentielles

- La récolte des parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) de la plante *Thymus fontanesii* (Thym) a eu lieu dans la station de Lala Setti de la région de Tlemcen, en pleine saison florale, en Mai 2017 .
- Les boutons floraux de *Syzygium aromanticum* (Girofle), étaient achetés chez un herboriste à Tlemcen en Janvier 2017, ayant une origine Indonésienne (cf. Tableau n°X).

Tableau n°X : Provenance des plantes aromatiques étudiées

	Le Thym	Le Girofle
Nom botanique	<i>Thymus fontanesii</i>	<i>Syzygium aromanticum</i>
Nom arabe	Zàateur, زعتر	Korenfel, قرنفل
Origine	Plateau LALA SETTI (1000mètres d'altitude, sud-ouest, Tlemcen)	Indonésie
Récolte/Achat	Récoltée en Juin 2017	Achetée chez un herboriste en Janvier 2017

- L'extraction des huiles essentielles (HEs) était réalisée au laboratoire des Produits Naturels avec l'équipe « Activité antimicrobienne des substances naturelles et écologie microbienne », Faculté de Biologie, par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (Figure n° 25), «cf Annexe 6 »

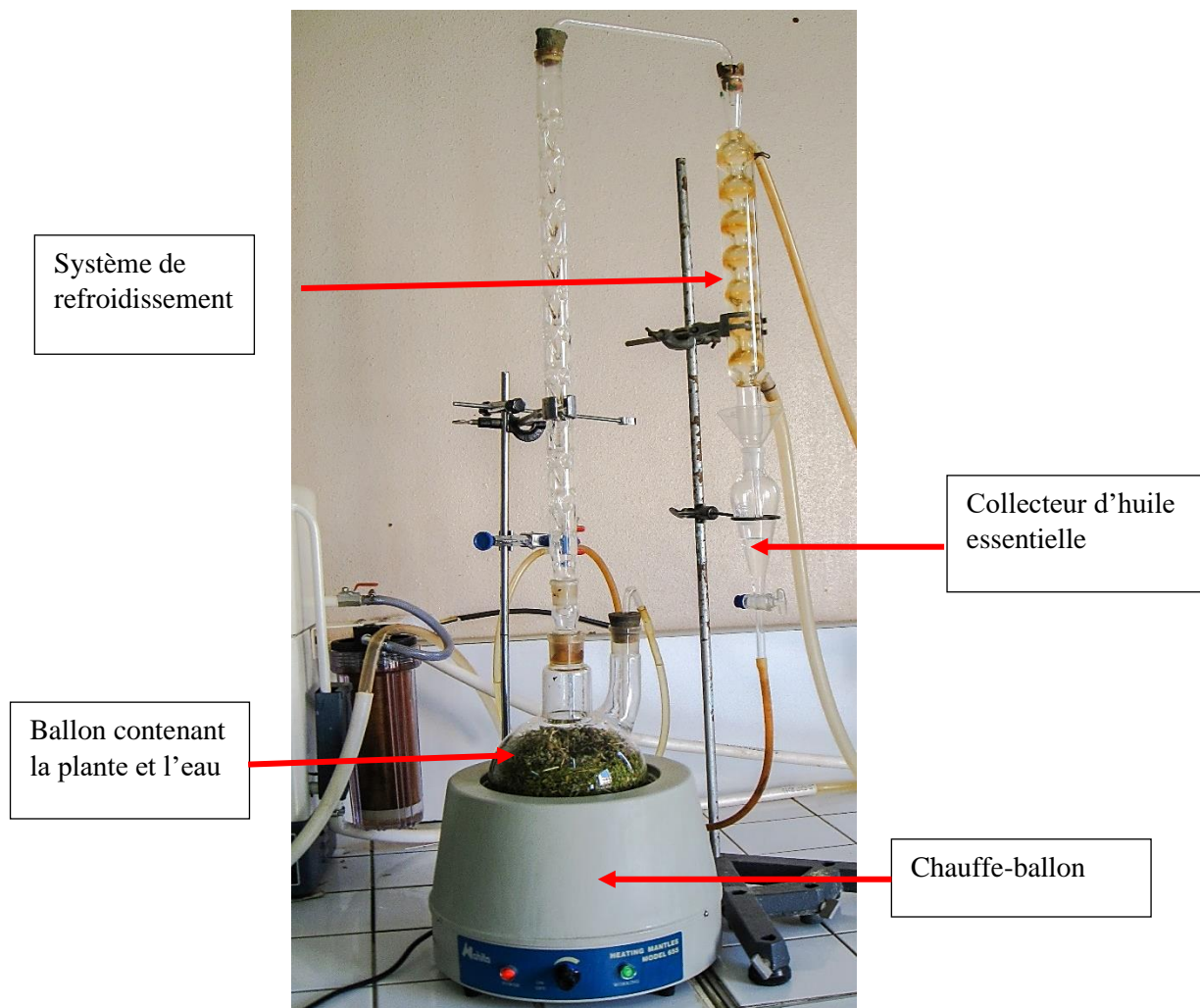


Figure n°25 : Extraction des huiles essentielles de Thym et de Girofle par hydro distillation. Iconographie personnelle - Laboratoire de Produits Naturels – Tlemcen.

Les HEs étaient conservées à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur, afin d'éviter leur dégradation, contenues dans des flacons en verre opaques fermés hermétiquement, et entreposés debout à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figure n° 26).



Figure n° 26 : Les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Syzygium aromanticum* dans des flacons opaques. Iconographie personnelle- Laboratoire de Produits Naturels – Tlemcen.

❑ Calcul de la teneur des plantes en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle représente le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante sèche. Exprimé en pourcentage, et calculé par la formule de suivante[44]:

$$\mathbf{Rd} = \text{Rendement de l'huile essentielle en \%} = \frac{P \text{ "huile"}}{P \text{ "plante"}} \times 100$$

P_{huile} : Poids de l'huile en g , P_{plante} : Poids de la plante en g

b. Analyse chimique des huiles essentielles

- Les analyses des HE s'étaient réalisées au Laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse-Centre Nationale de Recherche Scientifique CNRS, par Chromatographie en Phase Gazeuse avec indice de rétention CPG-Ir à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer type Clarus 500, et par Chromatographie couplée à la Spectrométrie de Masse CPG-SM à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer TurboMass « cf Annexe 7 ».
- L'objectif de cette analyse a permis d'identifier et de quantifier précisément les nombreux constituants présents dans l'HE, même en très petites quantités, voire en traces.

❑ Par Chromatographie en Phase Gazeuse

La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) avait pour objectif de séparer les composés de l'échantillon.

La quantité d'huile essentielle injectée était de 0,1 µL.

Les constituants étaient identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (Ir) calculés par rapport à une série d'alcane (C₈-C₂₈) avec interpolation linéaire sur les deux colonnes, avec ceux des composés de référence contenus dans la bibliothèque du laboratoire.

❑ Par Spectrométrie de Masse

La Spectrométrie de Masse (SM) avait pour objectif la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,5µL.

c. Etude in vitro de l'activité antifongique des huiles essentielles et de leur combinaison

L'évaluation de l'activité antifongique des HEs, seuls et en combinaison ,vis-à-vis des levures du genre *Candida albicans* (Tableau n°XI), était réalisées par des méthodes conventionnelles mises au point *in vitro* permettant l'étude des **paramètres antifongiques** suivants[84]:

- Le diamètre de la zone d'inhibition (IZ) caractérisant une sensibilité qualitative par la méthode de diffusion sur disque.
- La concentration minimale inhibitrice (CMI) appréciée quantitativement par la méthode de

micro dilution sur milieu liquide

- La concentration minimale fongicide (CMF) appréciée quantitativement par la méthode de micro dilution sur milieu liquide
- La concentration inhibitrice semi maximale (IC₅₀) déterminée graphiquement.

❑ Préparation des inoculums

Le Tableau n° XI représente les souches de *Candida* utilisées dans notre étude ainsi que leur provenance.

Tableau n°XI : Provenance des souches de *Candida*

Souches et leur provenance	Nombre	Espèce
Souches de références (Laboratoire de produits naturels)	02	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
		<i>Candida albicans</i> ATCC 26790
Souches cliniques isolées	05	<i>Candida albicans</i> identifiées

L'inoculum représente une suspension de microorganismes prête à être étalée sur un milieu de culture.

- La revivification des souches fongiques permettait d'obtenir une phase exponentielle de croissance.
- La turbidité des inoculums évaluait leur charge microbienne, par un scan des milieux de croissance et une lecture de la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre (WPA Biowave II®)
- La densité optique retenue **pour nos tests microbiologiques était de 0,12 à 0,15**(pour une longueur d'onde $\lambda = 530$ nm) (Figure n° 27), qui correspond à une charge en levures de $1 \text{ à } 5 \times 10^6$ UFC/mL [163].



Figure n° 27: Mesure de l'absorbance de l'inoculum à 0,12 – 0,15 (10^6 UFC/mL).
Iconographie personnelle - Laboratoire « Produits Naturels » Faculté de Biologie Tlemcen.

❑ **Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles par la méthode de diffusion sur disque : méthode de l'aromatogramme**

- Les tests étaient réalisés au sein du laboratoire de Produits Naturels Faculté de Biologie de Tlemcen, par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide : Sabouraud - Chloramphénicol [217] (Fig n° 28) « cf. Annexe 8 »
- La croissance des champignons était surveillée par l'apparition ou l'absence de colonies, après exposition aux huiles essentielles via des disques imprégnés.
- **L'obtention d'un halo clair autour de ce disque indiquait une zone d'inhibition au développement des levures** (Fig n°29).
- Les zones d'inhibition des différentes huiles ont été mesurées et comparées entre elles avec tous les isolats cliniques et l'isolat de laboratoire (Tableau n°XII)..
- La sensibilité des levures aux huiles essentielles était proportionnelle à la taille de la zone d'inhibition (IZ), qui était mesurée en (mm) disque inclus (Tableau n°XIII).
- La recherche d'une concentration minimale inhibitrice était entreprise devant un résultat positif.



Figure n° 28: Illustration de la méthode de l'aromatogramme [225] adapté de Zaiki 1988.

Tableau n°XII : Evaluation de l'activité antifongique par méthode de diffusion sur disque : Absence de croissance des levures autour du disque (cercle rouge) formant une zone d'ihibition.
 Iconographie personnelle - Laboratoire de Produits naturels -Tlemcen.




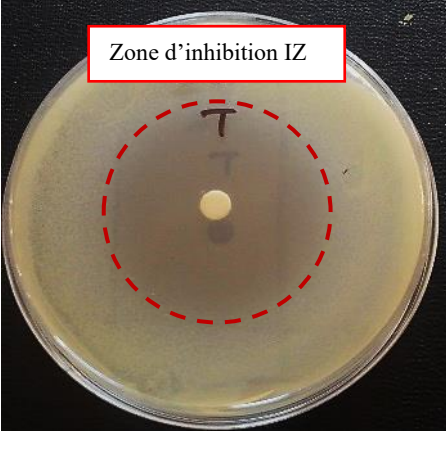
	<u>Avant incubation</u>	<u>Après incubation de 48H</u>
Disque imprégné de l'huile essentielle de Girofle		 Zone d'inhibition IZ
Disque impégné de l'huile essentielle de Thym		 Zone d'inhibition IZ

Tableau n° XIII:Le diamètre de la zone d'inhibition et activité de l'HE[56, 134]

Halo inhibition (mm)	Activité de l'HE	Sensibilité
0-10	Inactive	Résistant
≤12	Peu active (+)	Sensible doses dépendent
≥ 16	Très active (+++)	Très sensible

❑ **Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales fongicides des huiles essentielles**

- Les tests microbiologiques étaient effectués au laboratoire de recherche universitaire « Biomatériaux et inflammation en site osseux » BIOS EA 4691, qui comprend plusieurs équipes de recherche, Pôle Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.
- La recherche des concentrations minimales inhibitrices CMI et concentrations minimales fongicides CMF des HEs de Thym, de Girofle et de leur combinaison, était réalisée par la méthode de micro dilution « cf. Annexe 8 » sur milieu liquide (bouillon de culture) « cf. Annexe 4 » dans des microplaques de 96 puits (Fig n°29) , selon plusieurs concentrations (Tableau n° XIV).
- La mesure de l'absorbance des puits était recueillie à l'aide d'un lecteur de microplaque SPECTROstar Nano (Figure n° 30).
- Le puit témoin de contrôle de la croissance fongique représentait 100% de survivance, les résultats étaient évalués en pourcentage par rapport au témoin.

Le calcul du pourcentage de survivance des *Candida albicans* dans les tubes expérimentaux, était exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{n}{N} \times 100$$

N : Nombre de colonies dans le puit témoin

n : Nombre de colonies dans le puit expérimental



Figure n°29 : Evaluation de l'activité antifongique par méthode de microdilution sur microplaques de 96puits contenant les échantillons d'HEs :(A) Thym, (B) Girofle, (C) Combinaison de Thym et de Girofle, à différentes concentrations. Iconographie personnelle- Laboratoire BIOS – Université de Reims.



Figure n°30 : Lecteur de microplaque pour la mesure de l'absorbance SPECTROstar Nano (Labtech BMG) servant à la détermination de la CMI.
Iconographie personnelle. Laboratoire BIOS – Université Reims Champagne-Ardenne.

Tableau n° XIV : Les concentrations des HEs testées sur microplaque.

Concentrations testées(μL/mL)	<u>1^{er} puit</u>	<u>2^{em} puit</u>	<u>3^{em} puit</u>	<u>4^{em} puit</u>
HE Thym	0,250	0,125	0,0625	0,0312
HE Girofle	1	0,5	0,250	0,125
HEs Girofle + Thym	1/0,250	0,5/0,125	0,0625/ 0,0625	0,125/ 0,0312

**La CMI de chaque échantillon étudié était définie comme la concentration minimale ne montrant aucune croissance visible à l'œil nu, au bout de 24h d'incubation[115] (cf. Tableau n°XV).*

La CMF était recherchée par dénombrement de colonies sur milieu de culture, en comparant le nombre de colonies entre l'inoculum de départ et après l'action des HEs.

***La CMF représentait la dose létale, c'est à dire la plus petite concentration du produit qui laisse survivre au plus 0,01% des germes de la suspension de départ en 24 heures(une levure sur 10 000) [115] (Tableau n°XV).**

Le rapport $\frac{CMF}{CMI}$ de chaque extrait était calculé afin de qualifier les produits de fongistatique ou de fongicide [55].

- si le rapport $\frac{CMF}{CMI} \leq 4 \rightarrow$ la substance testée est fongicide.

- si le rapport $\frac{CMF}{CMI} > 4 \rightarrow$ la substance testée est fongiostatique.

L'indice de la concentration inhibitrice fractionnaire (**FICI** : fractional inhibitory concentration index) a été recherché [199] pour évaluer l'effet combinatoire du mélange des HEs, qui peut être :

- **Antagoniste** : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des HEs. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque HE prise séparément :

$$(A + B) < \text{effet A ou effet B.}$$

- **Indifférent** : l'activité antimicrobienne d'une HE n'est pas affectée par l'autre :

$$(A + B) = \text{effet A ou effet B.}$$

- **Additif** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque HE étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association :

$$(A + B) = \text{effet A} + \text{effet B.}$$

- **Synergique** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque H.E. étudiée isolément, à la même concentration :

$$(A + B) > \text{effet A} + \text{effet B.}$$

Le FICI était calculé à partir de la somme de la concentration inhibitrice fractionnelle (FIC) de la première HE et la FIC de la deuxième HE. [167]

La FIC de l'HE est obtenue en divisant la CMI de l'huile essentielle lorsqu'elle est utilisée en combinaison, par la CMI de l'HE seule. Le même calcul est effectué pour l'autre HE.




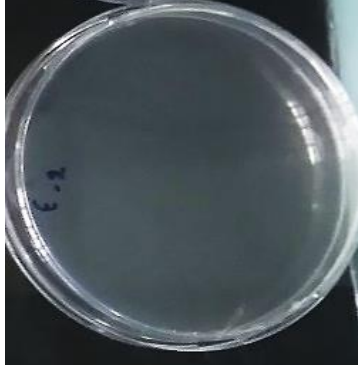

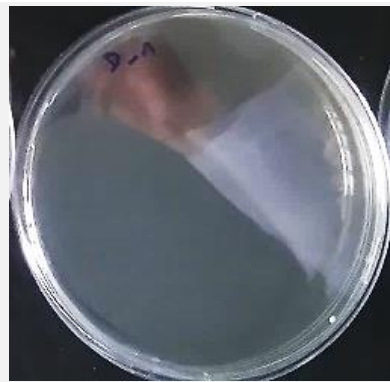
$$FIC_{HE} = \frac{CMI_{\text{combinaison}}}{CMI_{\text{seule}}}$$

$$FICI = FIC_{1\text{ère HE}} + FIC_{2\text{ème HE}}$$

L'interprétation de la FICI est comme suit :

- Combinaison synergique $\rightarrow FICI \leq 0,5$
- Combinaison additive $\rightarrow 1 \geq FICI > 0,5$
- Combinaison indifférente $\rightarrow 4 \geq FICI > 1$
- Combinaison antagoniste $\rightarrow FICI > 4$

Tableau n°XV: La CMI (à gauche) et la CMF (à droite) des huiles de thym et de girofle et de leur combinaison sur boîte Pétri. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS –Université de Reims.

	CMI = Inhibition de la croissance visuelle des levures + Croissance des colonies sur boîte Pétri	CMF = Aucune croissance des levures sur boîte Pétri
Evaluation de l’Huile de Thym		
Evaluation de L’Huile de Girofle		
Evaluation de la Combinaison des deux huiles de Thym et de Girofle		

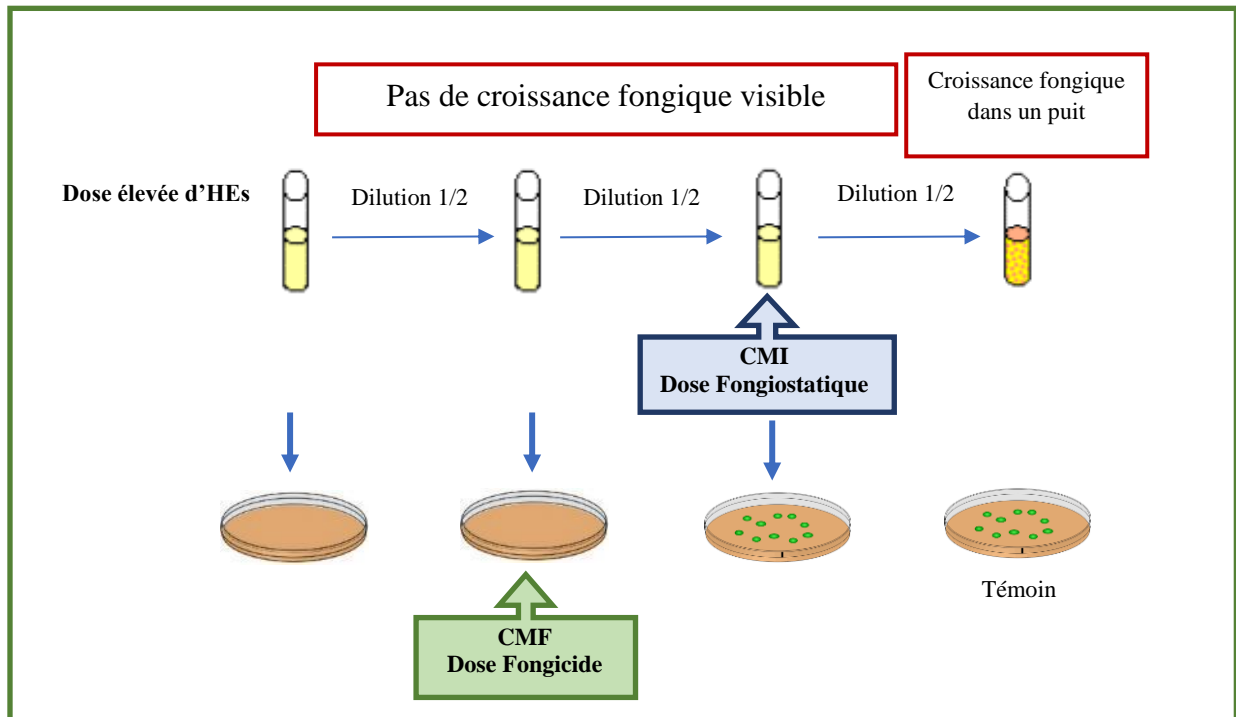


Figure n° 31 : Schéma représentatif de l'évaluation *in vitro* de l'activité antifongique des HEs testées par la méthode de micro-dilution sur milieu liquide et de dénombrement de colonies sur milieu gélosé.

❑ Détermination des concentration inhibitrice semi-maximale des huiles essentielles

La demi concentration inhibitrice d'une substance (IC_{50}) était déterminée graphiquement en recherchant la concentration qui cause une inhibition de croissance de 50% des levures.

Elle représente une mesure de l'efficacité d'un produit antagoniste, plus elle est faible plus l'inhibiteur est puissant.

2.5.3.2 Etude comparative *in vitro* de l'activité antifongique d'un gel préparé avec le Miconazole

a. Formulation et préparation d'un gel buccal à base des huiles essentielles étudiées

Le but de notre étude était d'incorporer les HEs dans une forme galénique pharmaceutique semi-solide sous forme d'un gel buccal pour le rendre administrable au patient, et optimiser son action thérapeutique (temps de contact suffisant) par une application locale topique sur la lésion candidosique.

Par ailleurs, il est déconseillé d'employer les huiles essentielles sous leur forme brute, en raison de leur toxicité, leur forte action aromatique, et leur pouvoir irritant [73, 123].

Un gel buccal à base des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Syzygium aromaticum*, et un gel de base SANS huiles essentielles contenant seulement les excipients (Figure n°32) étaient formulés et préparés par un pharmacien galéniste au Laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Médecine de Tlemcen « cf. Annexe 9 ».

-La dose du principe actif retenue était celle de **la CMF des HEs combinées**, pour garantir un effet antifongique maximal durant la biodisponibilité du produit dans la cavité orale (présence de la salive, système d'épuration, et desquamation de l'épithélium oral)

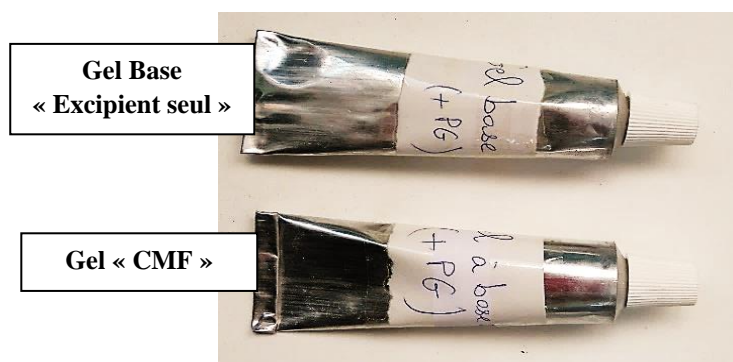


Figure n° 32 : Gel buccal à la dose CMF et gel de base conditionnés dans des tubes en aluminium.
Iconographie personnelle - Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Médecine Tlemcen.

b. Etude comparative de l'activité antifongique de notre gel préparé avec le Miconazole

- L'activité antifongique du gel buccal préparé était testée par la méthode de micro- dilution sur milieu liquide, au Laboratoire BIOS-Université de Reims, pour évaluer son efficacité après la formulation galénique.
- L'efficacité du produit était comparée à celle d'un produit pharmaceutique de référence le Miconazole, qui représente le « Gold standard » dans le traitement de la candidose orale.
- Cette comparaison nécessitait au préalable une préparation d'un gel concentré dix fois la dose de la CMF des HEs combinées « gel CMF×10 », pour le diluer au 1/10 directement dans une suspension fongique.
- Le Miconazole sert d'indicateur de la validité de nos conditions de travail dans la reproduction du modèle de traitement contre le *Candida albicans*.
- Sur deux microplaques de 24puits (Fig n° 33), 1mL d'inoculum était déposé, en aliquote, au contact des conditions suivantes :
 - 111,5 µL Gel CMF ×10
 - 250µL Gel Miconazole
 - 200µL Gel base
 - Contrôle négatif.

- Après 24h d'incubation à 30°C, des dilutions de l'ordre de 10⁻¹ et 10⁻² de chacune des conditions étaient étalées sur milieu de culture dans des boîtes de Pétri.
- **La lecture des résultats se faisait après 24h à 30°C, par la surveillance de la croissance ou de l'inhibition des levures.**
- L'évaluation de l'activité antifongique était qualitative avec un cadre de lecture de type : pousse ou non pousse de colonies, en raison d'une croissance abondante de colonies « en tapis » rendant le comptage très difficile, voire impossible (Fig n° 34).

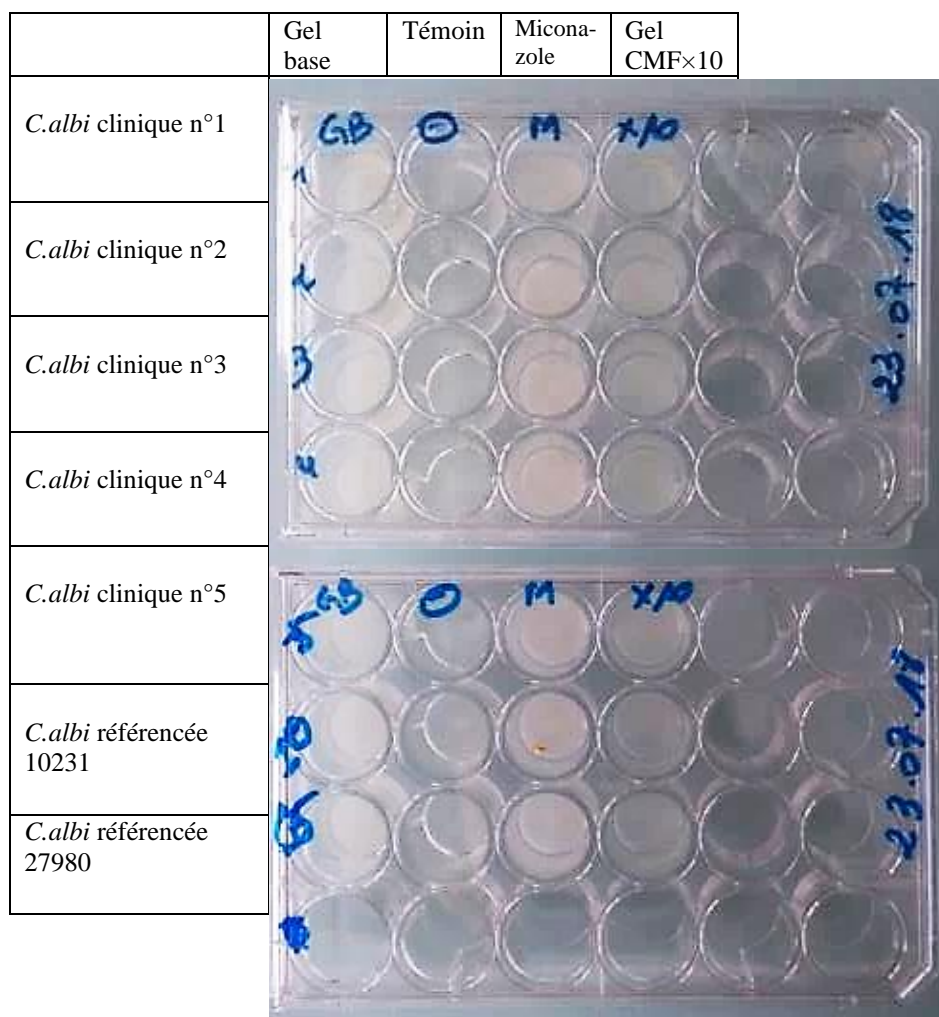


Figure n°33 : Comparaison de l'activité antifongique du gel CMF avec le Miconazole par la méthode de macro-dilution.
Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS –Université de Reims.

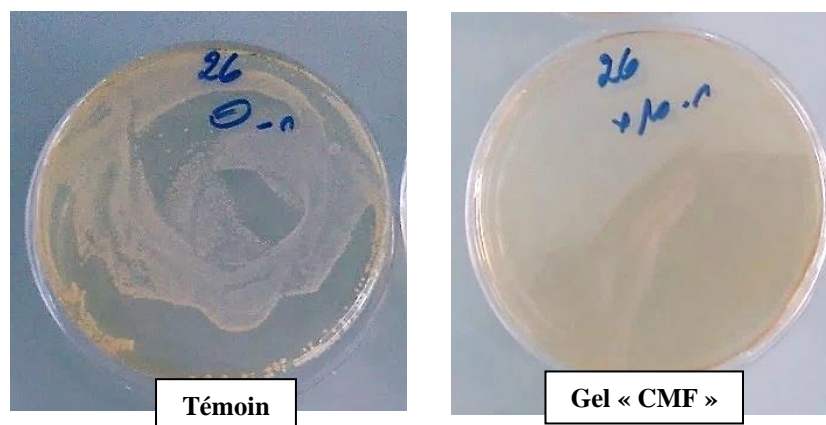


Figure n°34 : Exemple de croissance (condition témoin) et d’inhibition (condition de notre produit) des levures *Candida albicans* ATCC 26790 sur boîte Pétri. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS - Université de Reims.

c. Etude comparative de l’activité anti-biofilm de notre gel préparé avec le Miconazole

L’activité anti-biofilm à *Candida* du gel préparé avait été comparé à celle du Miconazole par la méthode de micro-dilution sur milieu liquide.

Le biofilm prothétique se forme sur la surface acrylique de la prothèse dentaire amovible, ce phénomène a été reproduit *in vitro*, en utilisant des échantillons de pastilles en résine acrylique infectées par une suspension fongique, sur lesquelles était testé notre produit.

□ Réalisation et désinfection des pastilles en résine acrylique

-La réalisation des échantillons de résine acrylique thermo-polymérisées sous forme de pastilles était effectuée au laboratoire de Prothèse Dentaire de la Faculté d’Odontologie de Reims, Champagne-Ardenne France.

-Les pastilles étaient conçues par la méthode conventionnelle de la polymérisation des bases à l’aide de moufles trempés dans un bain-marie (Fig n° 35) « cf. Annexe 10 ».

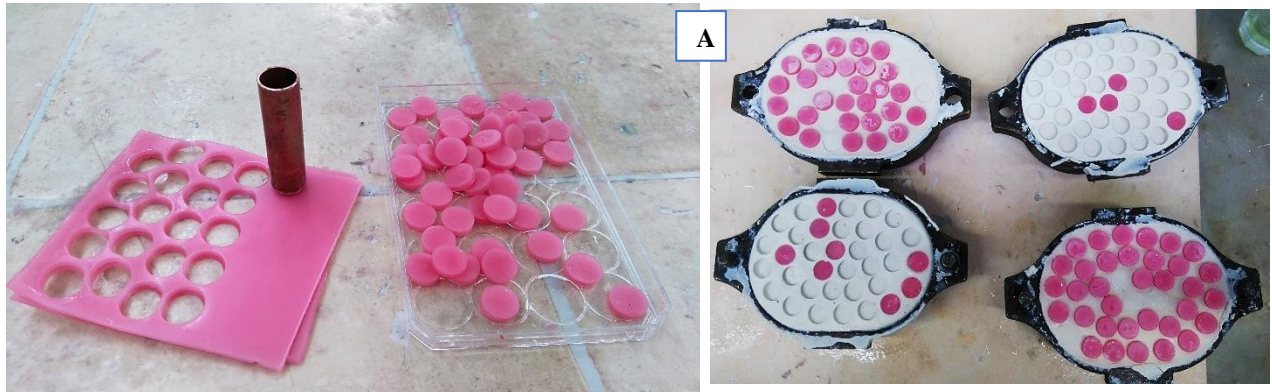


Figure n°35 (A) : Mise en moufle, ébullition et thermo polymérisation des pastilles en CIRE prédécoupées à l'emporte-pièce. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

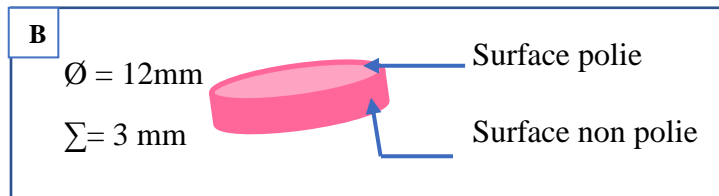


Figure n°35 (B) : Représentation schématique d'une pastille en RESINE acrylique. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

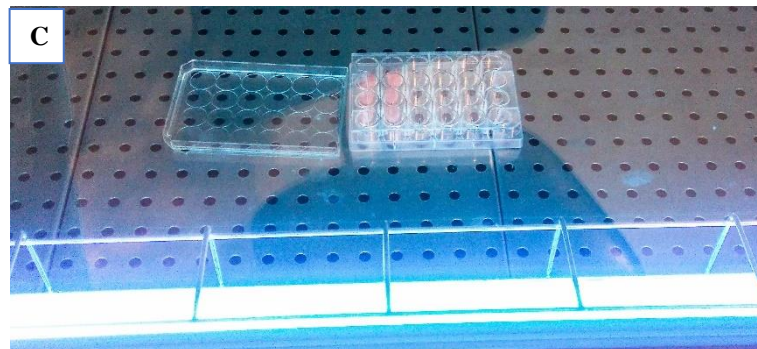


Figure n°35 (C) : Désinfection des pastilles à la lumière ultraviolette sous une hotte à flux laminaire. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

❑ Formation du biofilm à *Candida albicans*

-Dans une plaque de 24 puits, une incubation de 72h à 30°C des pastilles en résine, trempées dans une suspension fongique, préparée à partir d'une culture de nuit, évaluée à une DO de 0,12 -0,15 (λ 530 nm) permet la formation d'un biofilm mature (Fig n°36).

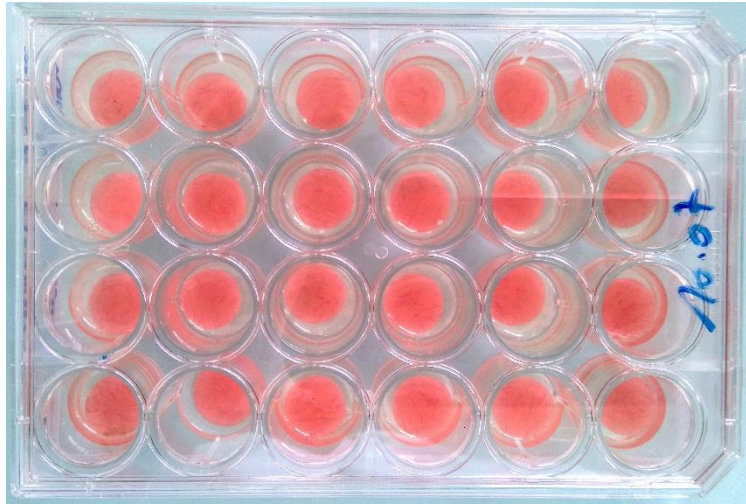


Figure n°36 : Formation d'un biofilm à *Candida albicans* sur les pastilles en résine.
Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

❑ **Procédure de dénombrement des colonies sur la pastille témoin**

- Une pastille témoin était retirée à 72h, pour dénombrer les cellules fongiques adhérentes (sessiles) et confirmer la formation du biofilm.
- Les pastilles récupérées avec une précelle stérile, étaient lavées dans un milieu propre en effectuant 10 mouvements de va et vient et replacées dans des Falcons contenant du milieu stérile.
- Ces tubes en plastiques étaient placés dans un bain à ultrasons (Transsonic 420 ELMA ®), soumis à une sonication d'une durée de 5min (Fig n° 37), pour détacher les cellules adhérentes sur les pastilles.
- Des dilutions du milieu contenant les germes, de l'ordre de 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} étaientensemencées sur milieu de culture dans des boites de Pétri, avant et après passage aux ultrasons, à Temps 0 (T0) pour dénombrer les levures libres (planctoniques) et à Temps 5 (T5) pour dénombrer les levures totales.
- Après incubation, on compte le nombre de colonies par boites, afin d'exprimer le résultat final en nombre de germes par millilitre (Fig n° 38).

Le nombre des cellules fongiques adhérentes est égal à la différence entre le nombre de cellules totales (à T5) et le nombre de cellules planctoniques (à T0).

$$\text{Nbre des cellules adhérentes} = \text{Nbre des cellules totales} - \text{Nbre des cellules libres}$$

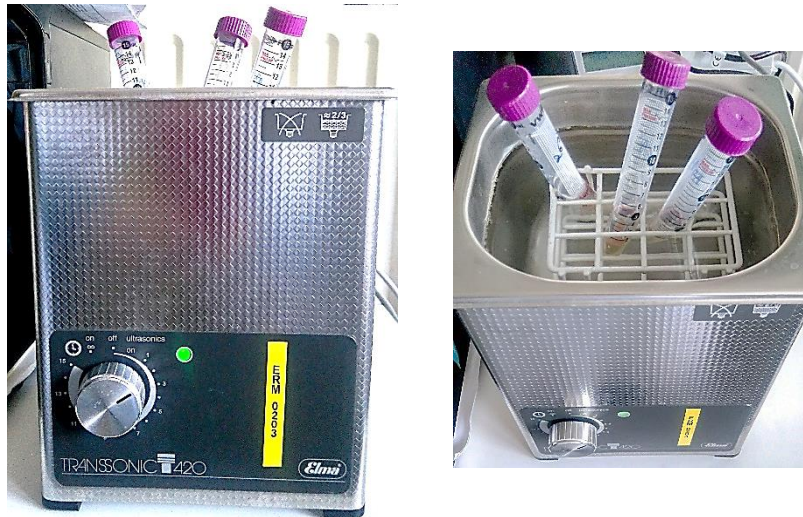


Figure n° 37 : Procédure de sonication pour décrochage des levures adhérees aux pastilles dans un appareil à ultrasons. Iconographie personnelle- Laboratoire BIOS, Université de Reims

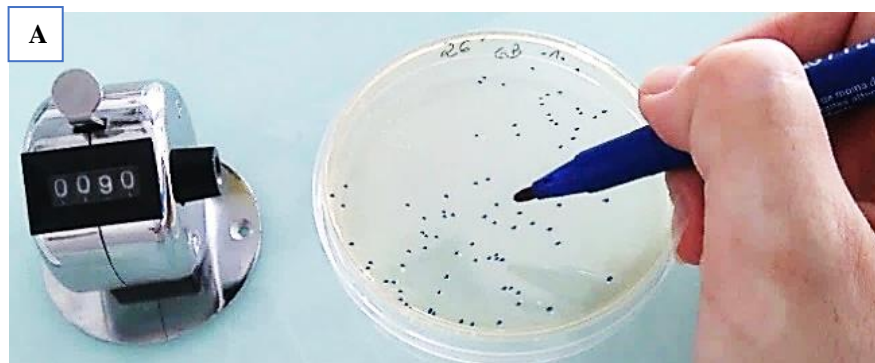


Figure n° 38 (A) : Méthode de dénombrement des colonies de levures sur une boîte de Pétri, à l'aide d'un compteur de colonies. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

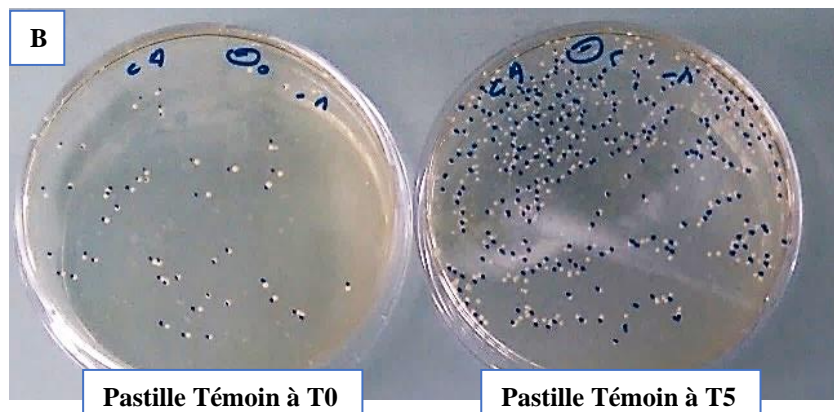


Figure n° 38 (B) : Exemple de dénombrement des colonies de levures *Candida albicans* (souche clinique), ayant poussées sur des boîtes de Pétri, qui ont adhérees sur une pastille infectée témoin, avant (T0 : gauche) et après sonication (T5 : droite) , Le milieu était dilué à 10^{-1} . Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

❑ Traitement des pastilles infectées avec le gel préparé et le Miconazole

- Pendant 24h à 30°C, les pastilles infectées étaient trempées dans des puits contenant les différentes conditions (Fig n°39) :
 - 400µL de Gel Base dans 600µL de l'inoculum
 - Gel « CMF ×10 » dilué au 10⁻¹
 - 800µL Miconazole pour 200µL d'inoculum.
 - Contrôle négatif.
- Les tests étaient effectués trois fois en triplicata.
- La même procédure de dénombrement était entreprise afin de dénombrer les cellules fongiques adhérees, après exposition aux différents produits (Fig n°40).

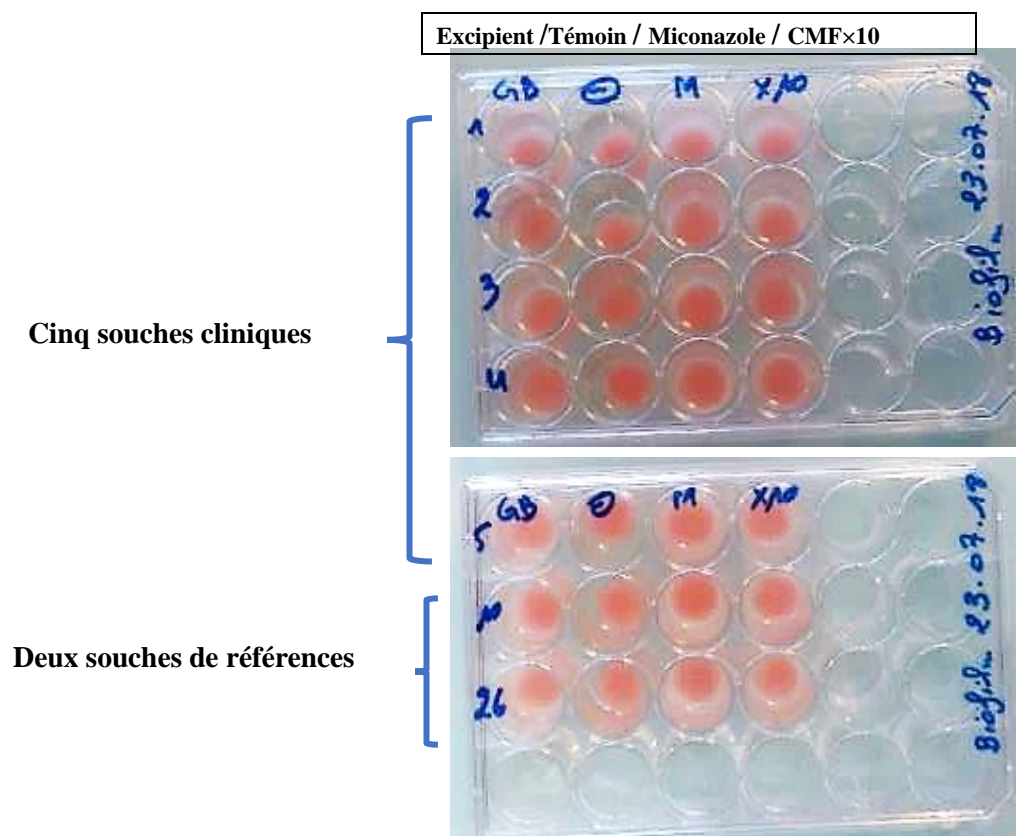


Figure n° 39 : Traitement des pastilles infectées par les *Candida albicans* avec les différents gels :

GB : gel base, excipient.

(-) : milieu contrôle.

M : Miconazole.

×10 : notre gel concentré 10 fois, puis dilué.

Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

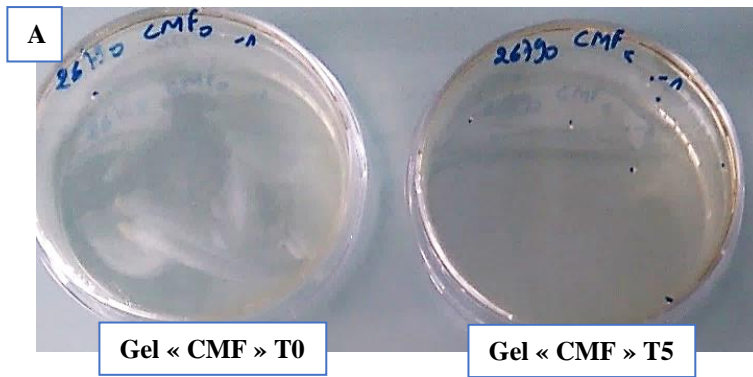


Figure n° 40 (A) : Inhibition presque totale de la croissance des levures *Candida albicans* (ATCC 26790) après traitement de la pastille infectée au gel buccal CMF, avant (T0 : gauche) et après sonication (T5 : droite). Les milieux étaient dilués à 10^{-1} .
Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

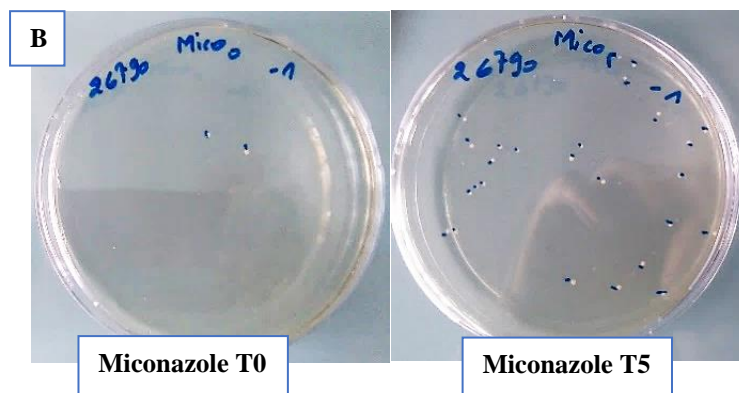


Figure n° 40 (B): Inhibition partielle de la croissance des levures *Candida albicans* (ATCC 26790) après traitement de la pastille infectée au Miconazole, avant (T0 : gauche) et après sonication (T5 : droite). Les milieux étaient dilués à 10^{-1} .
Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

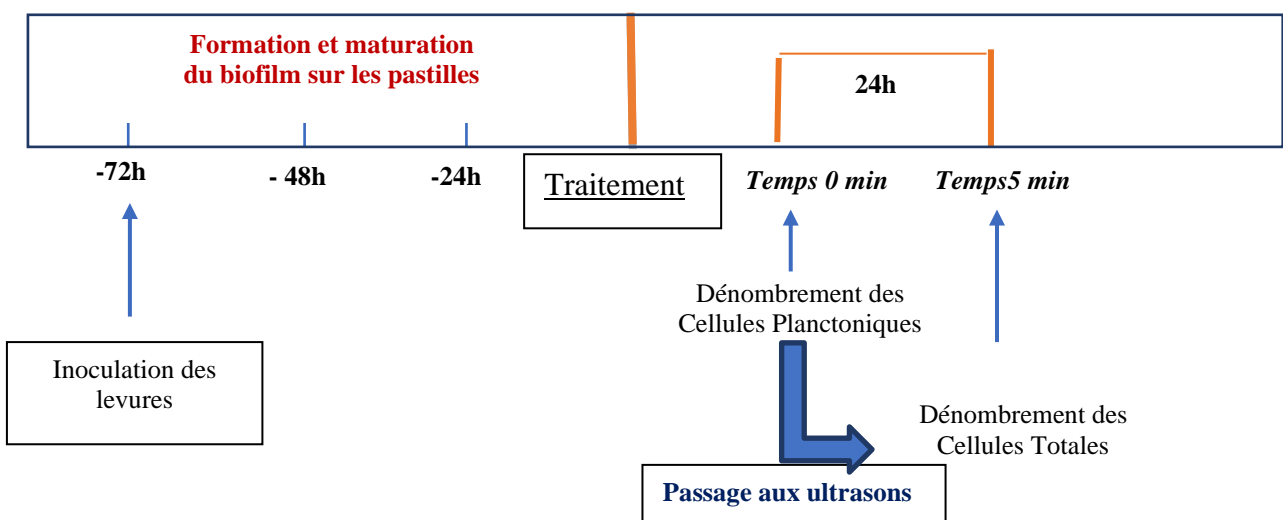


Figure n°41 : Diagramme schématique résumant notre manipulation de l'activité anti-biofilm à *Candida*.

2.5.3.3 Etude *in vitro* de la toxicité de notre gel préparé

- Un matériau biocompatible est un matériau qui n'engendre aucun problème biologique dans l'environnement où il est placé.

a. Etude *in vitro* de la cytotoxicité du gel préparé

La biocompatibilité c'est la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse appropriée de l'hôte pour une application spécifique[102].

La cytotoxicité était étudiée par une série de tests, donnés par la norme « Organisation Internationale de Normalisation » ISO 10993-5[111], évaluant *in vitro* les effets cytotoxiques du produit par contact direct avec des fibroblastes gingivaux humains (FGH), cultivés au sein du laboratoire BIOS « Biomatériaux et inflammation en site osseux » Université Reims- Champagne Ardenne, France.

□ Procédure de la culture cellulaire des Fibroblastes gingivaux humains

Le tissu conjonctif de la muqueuse orale est composé principalement de fibroblastes gingivaux humains (FGH), il présente l'avantage d'être facilement accessible et donc de permettre l'étude des fibroblastes qui le peuplent. Dans notre étude, les cellules étaient récupérées à partir de greffons prélevés, et placés dans une boîte de culture (Fig n°42). Après adhésion de l'explant, les cellules migrent hors du prélèvement et colonisent le fond de la boîte [85].

Les fibroblastes gingivaux étaient extraits à partir des déchets opératoires de gencives provenant d'extractions ou de désinclusions dentaires « cf Annexe 12 », réalisées au niveau du service de chirurgie buccale CHU Robert Debré Reims, auprès de trois patients âgés entre 18- 30 ans ayant donné leurs accords par un consentement éclairé et ne présentant aucune pathologie générale ou parodontale. «cf Annexe 11 » .

Dans cette étude, les FGH étaientensemencés au 3^{em} passage dans une plaque de 24 puits (Fig n°44), à 10 000 cellules/cm² par puit dans un milieu de culture DMEM complet, sous une hotte à flux laminaire, et incubées dans un incubateur pour culture cellulaire (Fig n°43) (après comptage des cellules sur la cellule de Thoma) « cf Annexe 12 ».

Les expériences étaient refaites deux fois.

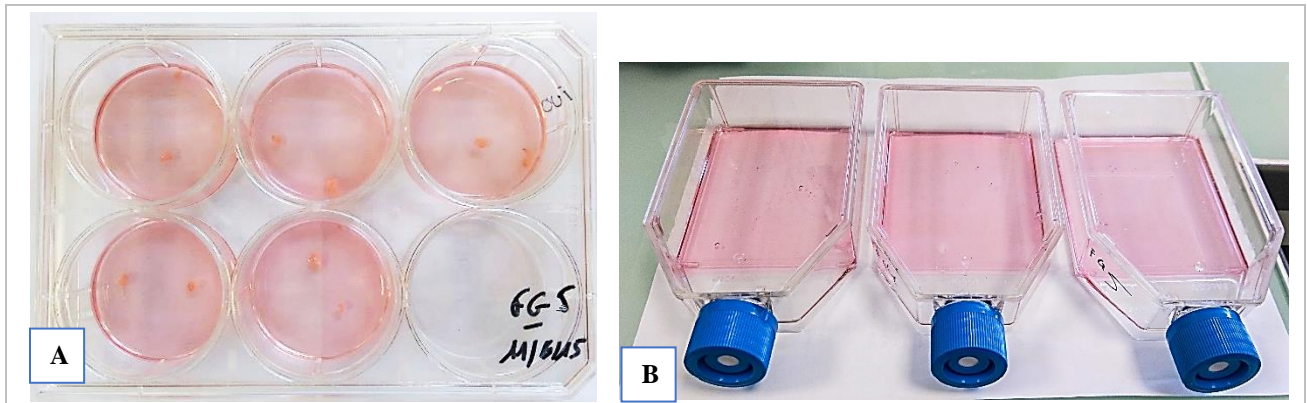


Figure n°42: Culture primaire (A) et secondaire (B) des fibroblastes gingivaux humains à partir des explants de la muqueuse orale. Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

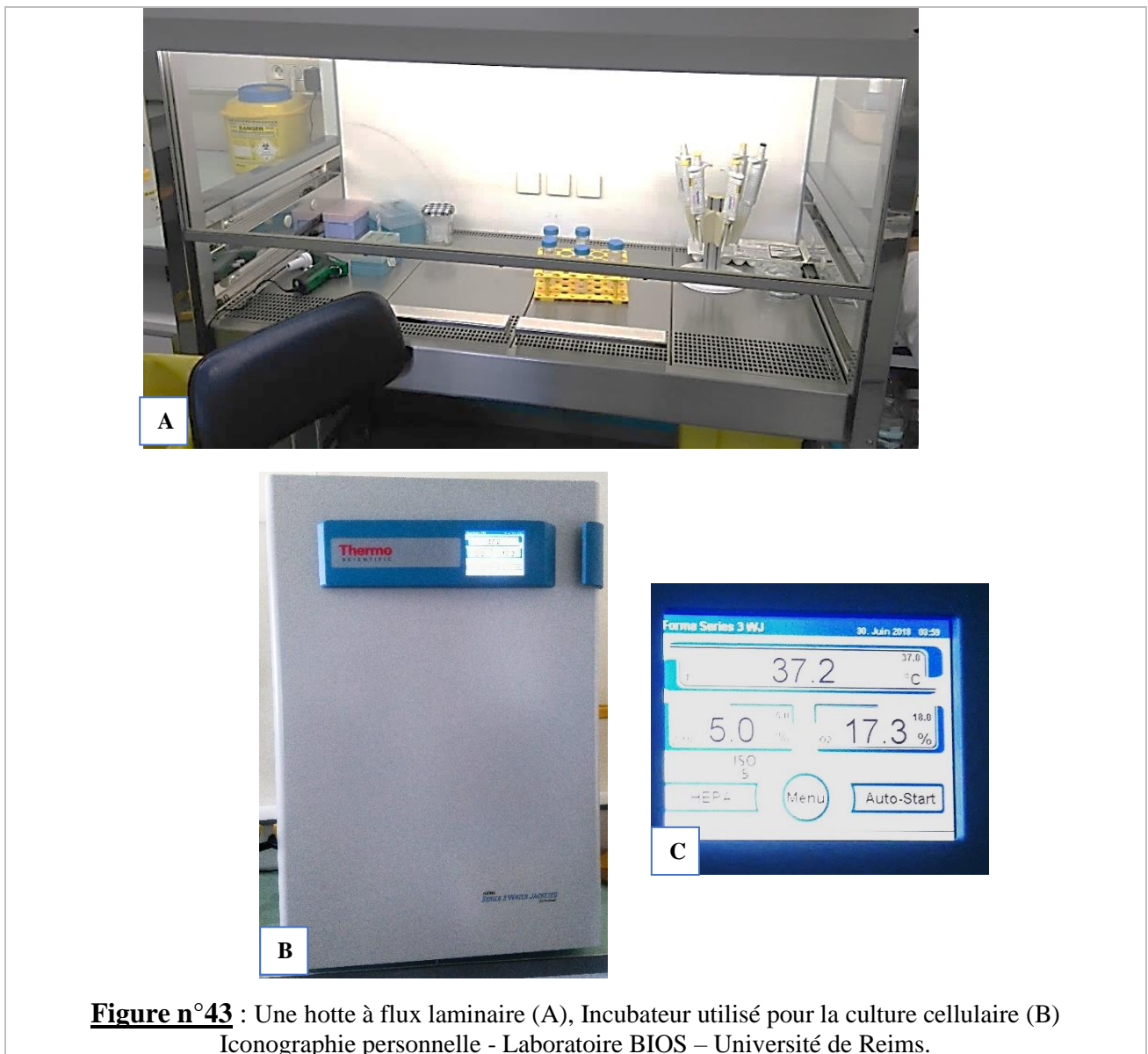


Figure n°43 : Une hotte à flux laminaire (A), Incubateur utilisé pour la culture cellulaire (B)
Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.



Figure n°44 : Une culture cellulaire secondaire des fibroblastes gingivaux humains dans des microplaques de 24puits, n=6.
Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

□ **Mise en contact des Fibroblastes gingivaux humains avec le gel buccal**

- Après une culture cellulaire de 24h, les cellules étaient observées au microscope inversé à écran (grossissement $\times 4$ et $\times 10$), pour contrôler leur viabilité, leur morphologie et leur confluence.
- Les préparations de gels buccaux étaient réalisées au préalable, d'une concentration de cinq et dix fois la CMF : « CMF $\times 5$ » et « CMF $\times 10$ » pour voir si la cytotoxicité est liée à des concentrations majorées.
- Une quantité de 0,5g des produits étaient pesées avec précision grâce à la balance Mettler AM50® (Fig n°45), pour être diluée dans 50mL de milieu de culture DMEM dans des flacons pour les conditions suivantes :
 - Gel CMF $\times 1$ (concentré une fois la dose de la CMF des HEs combinées)
 - Gel CMF $\times 5$ (concentré cinq fois la dose de la CMF des HEs combinées)
 - Gel CMF $\times 10$ (concentré dix fois la dose de la CMF des HEs combinées)
 - Gel base (excipient seulement) et le contrôle négatif (milieu DMEM) étaient utilisés comme témoins.
- 500 μ L de chaque produit était mis en contact direct avec les cellules, dans les puits.
- Les teste étaient refaits deux fois en triplicata.

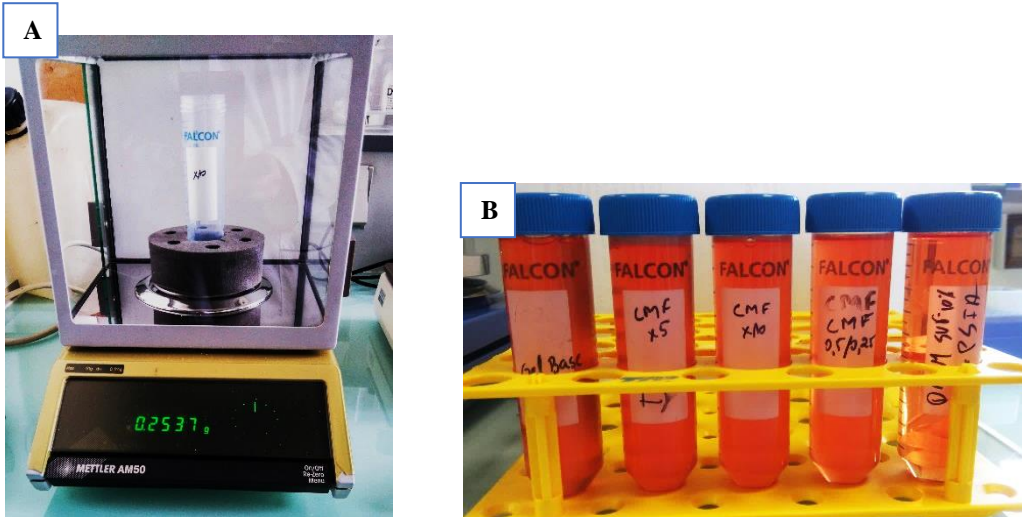


Figure n° 45 : (A) La pesée des produits avec précision,
 (B) La préparation des différentes conditions de gel avec les milieux de culture.
 Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS – Université de Reims.

Après 24 heures d'incubation, les éventuels effets cytotoxiques étaient évalués par :

- i. Une appréciation qualitative visant à observer les modifications morphologiques et l'apparition de lyse cellulaire
- ii. Une appréciation quantitative déterminée par trois mesures :
 - ✓ Mesure de l'activité mitochondriale renseignant sur la viabilité cellulaire
 - ✓ Mesure de l'ADN cellulaire
 - ✓ Mesure de la lactase déshydrogénase renseignant sur la mort cellulaire

Le produit testé peut induire des perturbations de la croissance ou de l'activité métabolique de ces cellules, avec une réponse minimale des cellules : supérieur à 70% par rapport au témoin.

□ Appréciation qualitative : Observation de la morphologie des fibroblastes gingivaux

Les cellules étaient observées au microscope inversé après 24h d'incubation en contact direct avec les différents produits mélangés au milieu de culture, à un grossissement $\times 4$ et $\times 10$.

Les FGH étaient observés au microscope optique inversé à lumière claire (EVOS XL) avant et après l'administration des différents produits à tester (en incubation à 37° pendant 24h), afin d'apporter une analyse comparative.

Le cadre de lecture visait à détecter des modifications de la morphologie des cellules, et de leur cohésion, qui pouvait traduire une lyse cellulaire.

Les modifications de la morphologie cellulaire qui peuvent être rencontrées [102] :

- Culture cellulaire à 60% de confluence avec présence de cellules vivantes, allongées en faisceau → Absence de cytotoxicité
- Présence de cellules mortes arrondies et lysées avec débris → Produit cytotoxique 100%

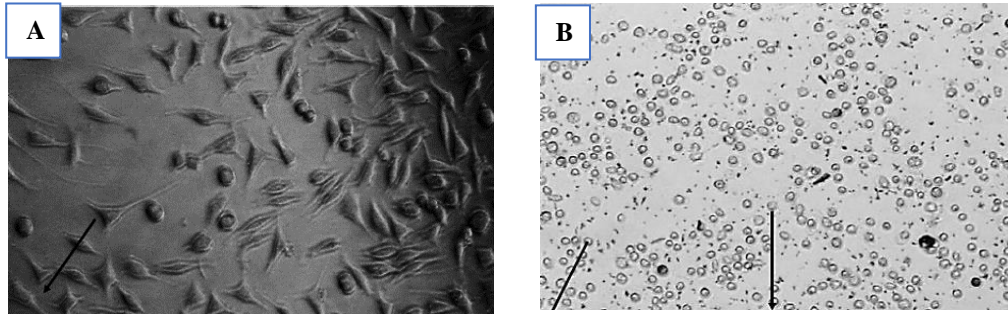


Figure n° 46 : Observation microscopique de la morphologie des cellules : (A) Cellules viables « flèche noire », (B) Cellules mortes « flèche noire » [102]

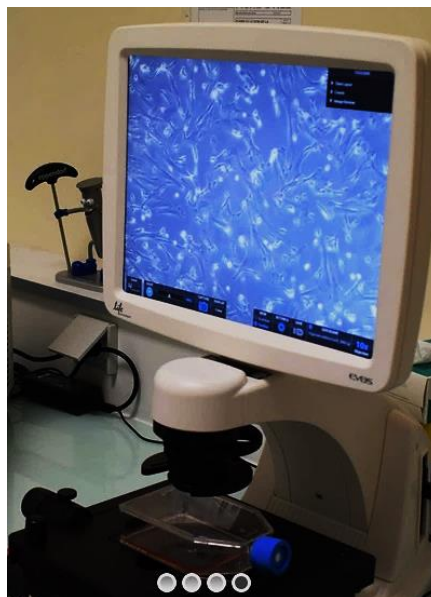


Figure n° 47 : Observation de la morphologie des cellules fibroblaste gingivales viables sous microscope photonique inversé à écran EVOS XL.
Laboratoire BIOS – Université de Reims.

❑ **Appréciation quantitative : Mesure de la viabilité cellulaire**

Il s'agit d'un test de quantification colorimétrique de cellules vivantes par évaluation métabolique servant à mesurer la toxicité d'un produit pharmacologique de cytotoxicité

- La viabilité de la culture était évaluée grâce à l'activité mitochondriale des cellules vivantes, qui réagit avec un réactif : le WST-1 (Water-Soluble Tetrazoliumsalts), ce test était effectué

sur des FGH ayant été cultivés dans des milieux : DMEM seul, et complétés avec les différents gels « CMF, CMF ×5, CMF ×10, et gel base », pendant 24 heures « Annexe 13 ».

L'activité métabolique des FGH dans leur milieu de culture a servi de contrôle pour le reste des conditions, et qui représente les 100% de nos cellules.

- A la mort cellulaire, l'activité des mitochondries disparaît et donc, avec elle, la potentialité de réduction des sels de tétrazolium (Fig n° 48)[67].
- **La quantité de précipité formée après la réaction chimique pourrait être proportionnelle à la quantité de cellules vivantes et à leur activité mitochondriale.**
- Cette activité mitochondriale, indicatrice de la viabilité cellulaire, était calculée comme le rapport d'absorbance entre les cellules traitées et non traitées (Fig n°49) (considérées comme 100% des fibroblastes gingivaux viables) mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Fig n°50).
- Les tests ont été réalisés deux fois en triplicata.

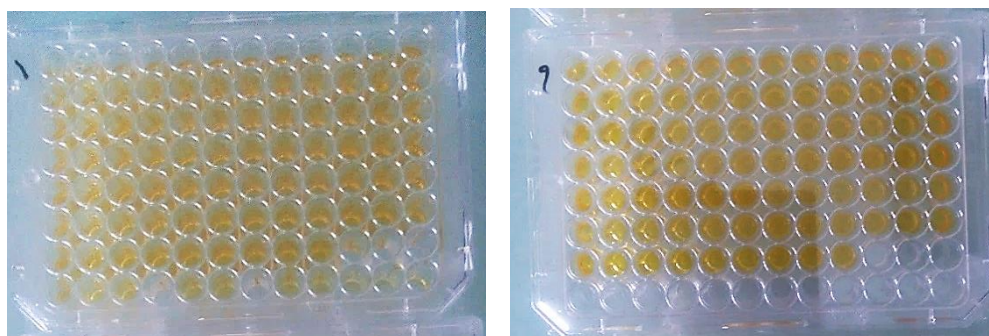
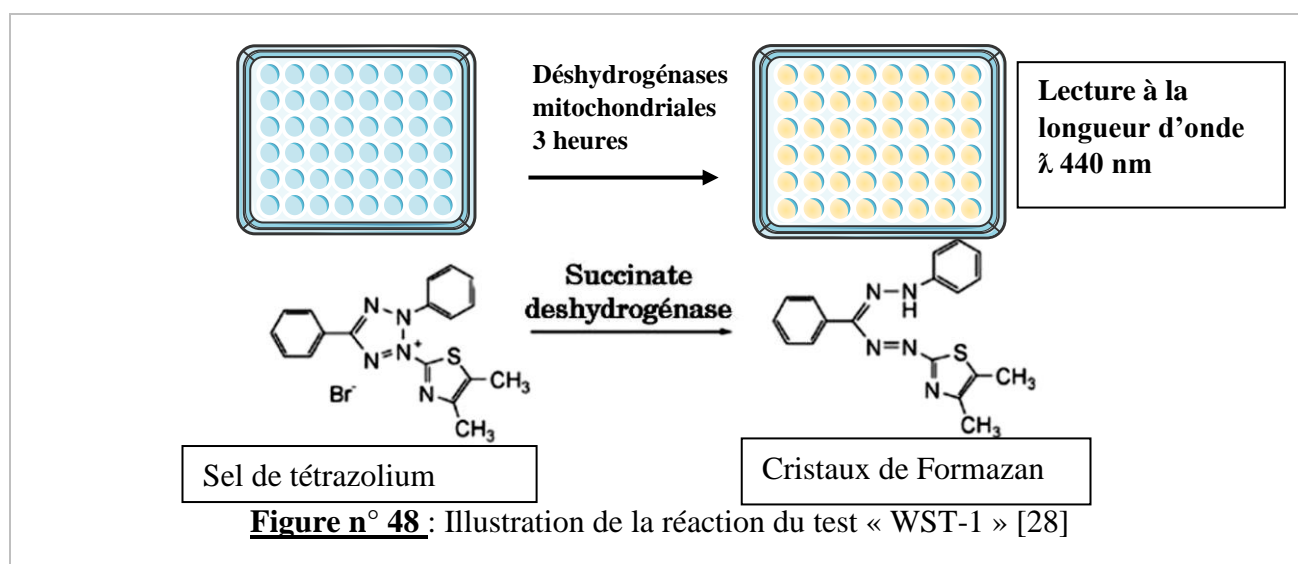


Figure n° 49 : Résultats du test de la cytotoxicité évaluée par « WST-1 » (Mesure de la viabilité cellulaire) Iconographie personnelle - Laboratoire BIOS -Université de Reims.



Figure n°50 : Lecteur de microplaque multi-modes FLUOstar Omega , servant à la mesure de l'absorbance pour les tests du WST-1 et LDH (test de cytotoxicité).
Iconographie personnelle- Laboratoire Bios – Université Reims Champagne Ardenne

□ Appréciation quantitative : Mesure de la quantité d'ADN cellulaire

Le but de cette manipulation était de quantifier le taux d'ADN des cellules présentes après traitement des cellules, afin de le corrélérer avec les résultats de l'activité métabolique cellulaire (WST-1) qui peut traduire :

* soit une augmentation du nombre de cellules.

* soit une augmentation de leur activité mitochondriale (les cellules viables peuvent respirer d'une manière accélérée, conséquence d'un stress cellulaire causé par un produit toxique)

Pour cela, une mesure de la quantité d'ADN cellulaire dans chacune des conditions de culture, permet d'obtenir la quantité réelle des cellules dans les puits.

L'ADN des FGH cultivés dans des milieux : DMEM, et additionnés aux différents gels « CMF, CMF ×5, CMF ×10 et gel base », était extrait après 24 heures de traitement avec le kit MasterPure™ DNA Purification (Epicentre Biotechnologies) conformément au protocole du fabricant « Annexe 13 »..

La quantité d'ADN extrait était évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre à micro volume (Figure n° 51).



Figure n°51 : Spectrophotomètre à micro volume Thermo Scientific™ NanoDrop 2000C, servant à la mesure de l'absorbance pour la quantification de l'ADN.

□ **Appréciation quantitative : Mesure de la Cytotoxicité**

- Le test de mesure de la cytotoxicité (la mort cellulaire) évalue la quantification de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH), qui est une enzyme cytoplasmique stable présente dans toutes les cellules et rapidement libérée dans le milieu (surnageant) de la culture cellulaire après endommagement de la membrane plasmique (Fig n°52).
- Le test de détection de la cytotoxicité de la LDH (Réactif : Cytotoxicity Detection Kit Roche®) était effectué sur des surnageants de culture cellulaire (Fig n°53) prélevés après 24 heures de culture de FGH dans un milieu DMEM seul, et avec les différents types de gels :

«CMF ×1, CMF ×5, CMF ×10 et gel base », selon le protocole du fabricant « Annexe 13 »..

L'augmentation de la quantité de LDH serait directement liée à l'augmentation du nombre de cellules lysées, La LDH relarguée étant un marqueur de perte de l'intégrité membranaire [67].

- La quantité de colorant formée était détectable par spectrophotométrie (Fig n°50) et est proportionnelle à celle du LDH libérée dans le milieu.
- Les tests étaient effectués en duplicata.

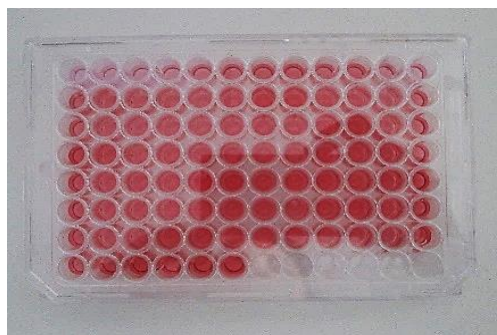
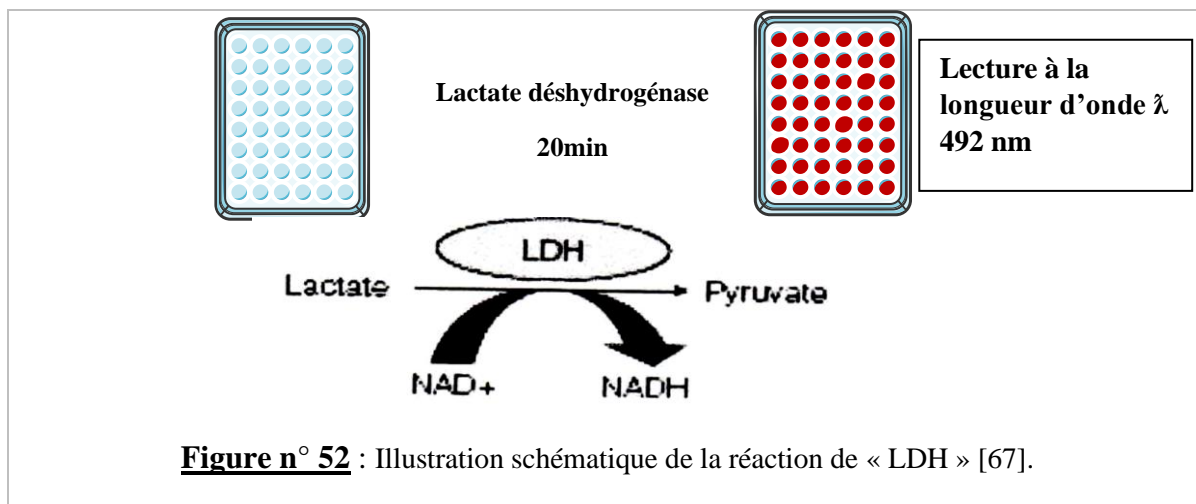


Figure n° 53 : Résultats du test de la cytotoxicité évaluée par « LDH » (Mesure de la mortalité cellulaire)
Iconographie personnelle Laboratoire BIOS -Université de Reims.
Iconographie personnelle. Laboratoire BIOS – Université Reims Champagne Ardenne.

Tableau n°XVI : Interprétation des résultats des tests de cytotoxicité.

	WST-1	Mesure ADN	LDH
Cellules mortes	-	+ / -	+
Cellules viables stressés	+	-	-
Cellules vivantes	+	+	-

b. Etude histologique et immunohistochimique des prélèvements muqueux placés au contact du produit

- L'évaluation de la compatibilité tissulaire du gel étudié était réalisée *in vitro* sur des prélèvements muqueux, par méthode de colorations histologique et immunohistochimique, en évaluant les activités cytotoxiques et apoptotiques du produit utilisé.
- Des échantillons de la muqueuse palatine issue de greffons (épithélium et chorion) étaient

prélevés en regard de la deuxième prémolaire et de la première molaire, chez deux patients pris en charge au CHU Robert DEBRE de Reims, ne souffrant d'aucune pathologies locale ou générale, et ayant donné leur accord par consentement éclairé « cf Annexe 11 »

- Les greffons palatins étaient noyés dans des milieux préparés : DMEM seul, gel base et gel « CMF » placés dans des Eppendorfs (Figure n°54) pendant 24h à 37°C, les échantillons étaient ensuite fixés au Formol pendant 24h pour être analysés par deux types de colorations à visée qualitative, réalisées séparément sur des coupes de tissus consécutives :
 - Coloration HES : qui renseigne sur les caractéristiques cytoplasmiques, nucléaires et extracellulaires de la matrice.
 - Et identification de la Caspase 3 clivée : qui renseigne sur l'apoptose cellulaire (mort cellulaire naturelle)

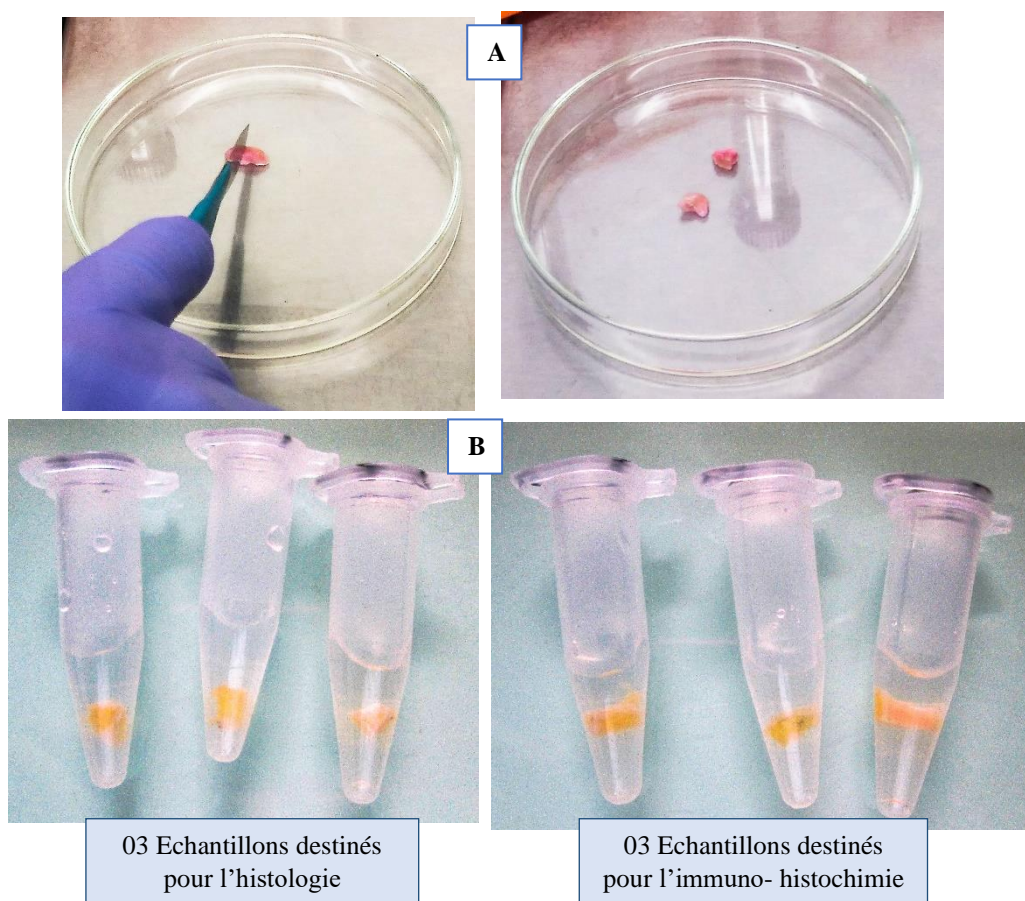


Figure n° 54 : (A) Découpage du greffon de la muqueuse palatine pour chaque greffon et (B) mise en place des échantillons de la muqueuse dans du sérum physiologique, 03 échantillons de chaque greffon pour les conditions de : Gel CMF, Excipients et Témoin.
Iconographie personnelle- Laboratoire BIOS- Université de Reims.

❑ Etude histologique par coloration Hématéine Eosine Safran

Les colorations histologiques ont pour but de mettre en évidence les différents constituants des cellules (noyau, cytoplasme) et de la matrice extra-cellulaire (collagènes.) La coloration Hématéine Eosine Safran (HES) est une coloration de routine en histopathologie, trichromatique, connue comme la coloration de la viabilité cellulaire.

L'hématoxyline-éosine-safran (HES) était réalisée sur les différentes coupes des zones tissulaires « cf Annexe 14 », et des images étaient prises au moyen d'un scanner iScan Coreo AU® (Roche Ô Ventana) employé en anatomie pathologie pour numériser les échantillons biologiques sur des lames de verre (Figure n°55).

-La distribution cellulaire (caractéristiques cytoplasmiques et nucléaires) et extracellulaires de la matrice de l'explant muqueux obtenue après coloration HES , est représentée dans le Tableau n°_XVII.

Tableau n° XVII: Les affinités des colorants HES

Colorants	pH	Constituants cellulaires	Couleur
Hématéine	Basique	Acides nucléiques (noyau)	Violet foncé
Eosine	Acide	Protéines (cytoplasme, matrice extracellulaire)	Rose
Safran	-	Fibres de collagène	Orange

❑ Etude immunohistochimique de l'activité apoptotique par identification de la Caspase 3 clivée

L'évaluation de l'apoptose cellulaire était réalisée par méthode immunohistochimique, qui est une méthode de localisation des protéines, dans une coupe de l'explant, par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps spécifiques marqués avec une enzyme , induisant une réaction antigène- anticorps. « cf Annexe 14 »

L'apoptose contrairement à la nécrose, est un processus physiologique où la mort cellulaire est génétiquement programmée, dans lequel les cellules activent un mécanisme intrinsèque de suicide conduisant à l'autodestruction, essentiel au renouvellement des tissus. Les protéases qui interviennent dans ce suicide cellulaire sont les caspases (Aspartate protéase cystéine), la mise en évidence de la caspase 3 clivée est un marqueur de l'apoptose nucléaire, y compris la chromatine, la condensation et la fragmentation de l'ADN, par conséquent la fragmentation des cellules.

La localisation du colorant est cytoplasmique et /ou nucléaire.

Des images étaient recueillies à partir des lames (Figure n°55) à l'aide d'un scanner iScan CoreoAU (Roche Ò Ventana).

Tableau n°XVIII : Caractéristiques différentielles de la nécrose et l'apoptose

Apoptose	Nécrose
Processus physiologique, actif	Processus pathologique, passif
Suicide cellulaire	Assassinat
Pas d'inflammation	Présence d'une inflammation
Affecte les cellules isolement	Affecte l'ensemble du tissu
Membrane cellulaire intacte	Rupture de la membrane cellulaire
Fragmentation nucléaire	Intégrité du noyau



Figure n° 55 : Préparation des lames d'histologie après coloration HES , et d'immunohistochimie par identification de la Caspase 3 clivé .

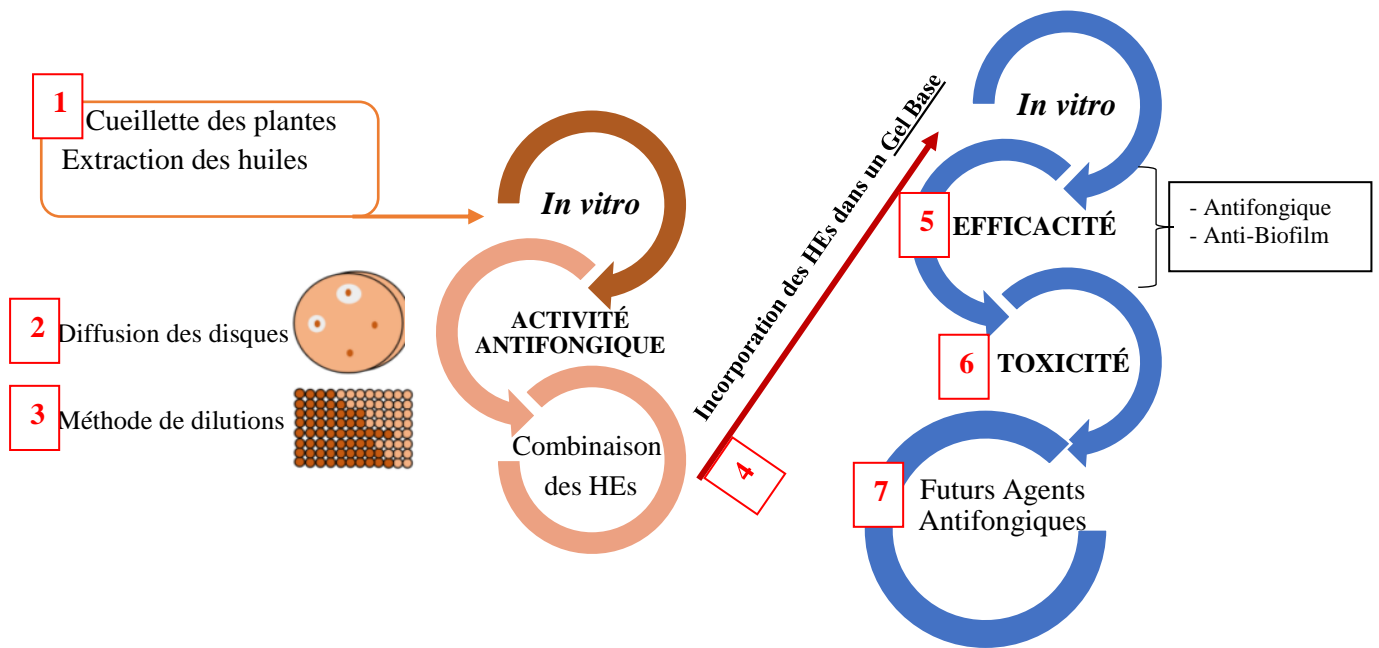


Figure n° 56 : Schéma représentatif des différentes étapes de notre phase expérimentale.

2.6 Variables de l'étude et Critères de jugement

2.6.1 Mesure du critère de jugement principal

- L'efficacité antifongique des huiles essentielles étudiées était évaluée par la recherche des CMI et des CMF des huiles essentielles séparément et celles de leur combinaison (cf Chapitre « Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI et des concentrations minimales fongicides CMF des huiles essentielles » « Page 63 »)

2.6.2 Mesure des critères de jugement secondaires

- L'efficacité antifongique et anti – biofilm à *Candida albicans* du gel buccal préparé à base de la combinaison des huiles étudiées, était comparée à celles du Miconazole (cf. Chapitre « Etude comparative de l'activité antifongique de notre gel préparé avec le Miconazole » « Page 68 »)
- La toxicité du gel préparé était évaluée par des tests de cytotoxicité (cf. Chapitre « Etude de la cytotoxicité du produit testé » « Page 82 »)

2.6.3 Définition des variables

Le questionnaire se déroule en deux phase successives, l'interrogatoire ensuite l'examen clinique, afin d'établir un diagnostic précis des stades de la stomatite prothétique.

L'interrogatoire comprenait les variables de l'identification du patient, l'âge était exprimé en année, et le sexe défini en féminin et masculin, ainsi que des questions portant sur l'hygiène bucco prothétique et quelques habitudes quotidiennes.

Pour l'item « Fréquence de l'entretien des prothèses » ayant comme possibilité de réponse « régulièrement » un brossage par jour, « souvent » un brossage par semaine, et « rarement » un brossage par mois.

Pour l'item « Port prothétique nocturne » la modalité de réponse « parfois » définissait un port nocturne occasionnel à raison d'une fois par mois.

2.7 Aspects éthiques

Cette étude était présentée à la commission locale de validation des sujets de thèse et au comité scientifique de la Faculté de Médecine de Tlemcen, qui ont jugé de l'aspect éthique de l'étude.

Les sujets étaient informés de façon complète et loyale, en des termes compréhensibles des objectifs de l'étude, sa méthodologie, les bénéfices attendus, et de leur droit de refuser de participer à l'étude. Les prélèvements n'étaient réalisés sur les patients qu'après lecture et approbation d'un consentement éclairé.

2.8 Collecte des données

- Pour l'étude épidémiologique, le moyen de recueillir les données était un questionnaire d'évaluation et une fiche de diagnostic mycologique.
- Pour l'étude expérimentale :
 - Les données de la caractérisation des HEs étaient collectées à partir d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse CPG-SM.
 - Les données de l'absorbance des milieux mélangés avec les HEs étaient recueillies grâce à différents spectrophotomètres lecteurs de plaque (lumière Ultra-violet – lumière visible) :
 - Spectrophotomètre lecteur de plaque a permis de mesurer l'absorbance des inoculum traités par les huiles essentielles.
 - Spectrophotomètre lecteur de plaque était utilisé pour mesurer l'absorbance des milieux de culture dans les tests de viabilité et de cytotoxicité (WST-1, LDH).
 - Spectrophotomètre à micro volume, pour mesurer la quantité d'ADN.
 - Les données de l'efficacité anti biofilm étaient réunies grâce à un dénombrement des colonies sur géloses par comptage comparatif des colonies microbiennes avant et après leur

décrochage des pastilles en résine.

- Les images cellulaires des fibroblastes gingivaux étaient obtenues grâce à un microscope inversé à écran.
- Les images histologiques étaient obtenues à partir d'un scanner des lames contenant les coupes histologiques.

Toutes les expériences ont été répétées trois fois et les données ont été exprimées en moyenne \pm écart type (SD).

Liste des autres appareils servant à la collecte des données de l'étude expérimentale :

- Chromatographie en phase gazeuse et spectrophotométrie de masse, qui ont servi à la caractérisation chimique des huiles essentielles.
- Microscope optique inversé avec écran a permis d'observer la morphologie cytologique des fibroblastes gingivaux humains

2.9 Traitement des données et Analyses statistiques

*Pour l'étude épidémiologique, Les données recueillies sont codées et saisies sur l'Excel (Microsoft office 2016) et l'analyse des données était réalisée sur le logiciel IBM SPSS Statistics version 23 pour Windows. Les techniques de statistique descriptive: présentation tabulaire et présentation graphique (moyennes, écart-type)

Pour l'étude expérimentale, toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism version 5.00 pour Windows , en utilisant le test non paramétrique de Mann et Whitney, une valeur de $p < 0,05$ a été acceptée comme statistiquement significative (niveau de rejet de l'hypothèse nulle de moyennes égales). ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)[182].

Les résultats quantitatifs étaient décrits par une moyenne utilisée comme indicateur de tendance centrale, plus ou moins l'écart type moyen qui est l'indicateur de dispersion associé à la moyenne. Ils étaient représentés sous forme d'un histogramme, et sous forme de box- plot où la dispersion des valeurs mesurées était appréciée, la barre centrale représentait la valeur médiane, et les extrémités inférieure et supérieure représentaient les premiers et troisièmes quartiles respectivement.

Une courbe de survivance des levures renseignait sur l'inhibition des levures au contact des huiles dans le temps, avec un intervalle de confiance.

Pour les variables qualitatives, les fréquences observées étaient rapportées avec un intervalle de confiance.

2.10 Retombées de l'étude

- Formulation et préparation d'un gel buccal à partir de produits naturels
- Proposition d'un protocole thérapeutique de prise en charge des patients présentant une stomatite prothétique.

CHAPITRE 3 :

Résultats et Interprétation

Résultats et Interprétation

Etant donné que notre recherche était scindée en deux études, les résultats se décomposent en :

- Une première partie qui permet de décrire notre population et de rapporter les variables étudiées.
- Une seconde partie qui expose les résultats de l'étude expérimentale.

Etude Epidémiologique

3.1. Résultats de l'Étude Epidémiologique

L'étude a porté sur 78 patients édentés et appareillés présentant des lésions de la muqueuse buccale induites par la prothèse du type stomatite prothétique, sur les 238 patients porteurs de prothèses totales bi maxillaires ayant consulté au sein du service de Prothèse Dentaire Clinique B -CHU Tlemcen durant une période de deux ans et quatre mois de Septembre 2016 à Janvier 2019 (Fig n° 57).

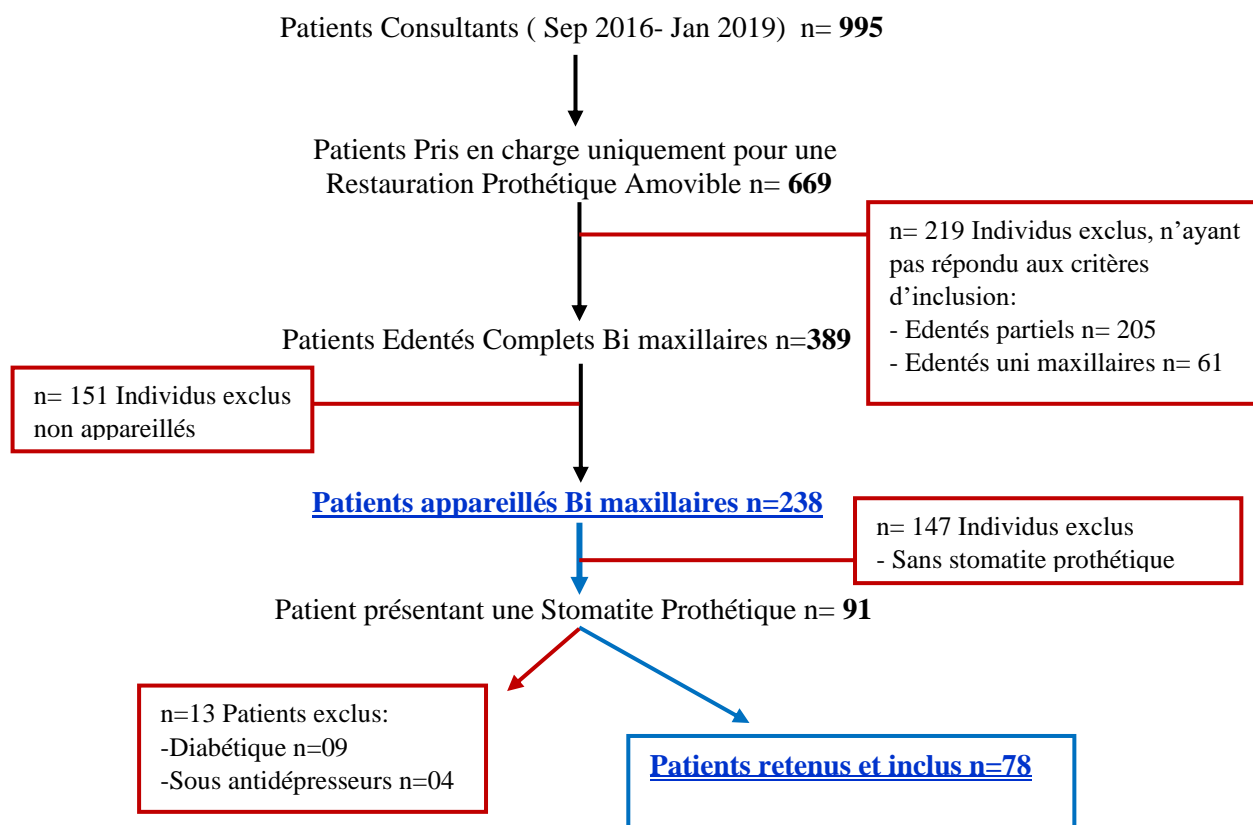


Figure n° 57 : Organigramme descriptif de la population incluse dans notre étude.

3.1.1. Données Sociodémographiques des patients

3.1.1.1. Répartition de la population selon le sexe

Parmi les 78 patients, 68% étaient des femmes et 32% des hommes avec sexratio de 0,47 (Fig. n°58).

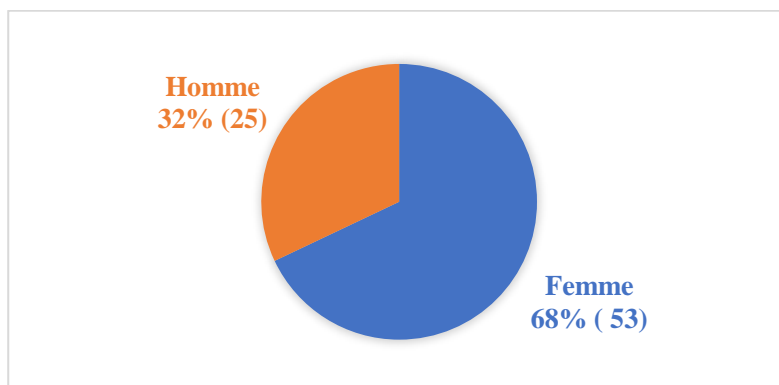


Figure n° 58 : Répartition de la population d'étude selon le sexe en pourcentage.
() nombre de sujets. n=78

3.1.1.2. Répartition de la population selon âge

L'âge des patients variait entre 40 et 76 ans, dont la tranche d'âge la plus fréquente est de [50 -60[(Fig. n° 59), avec une moyenne d'âge de 58,41 ans \pm 9,2 (Tableau n°XIX).

Tableau n° XIX : La répartition de la population d'étude selon l'âge.

	n	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
AGE (années)	78	58,41	9,2	40	76

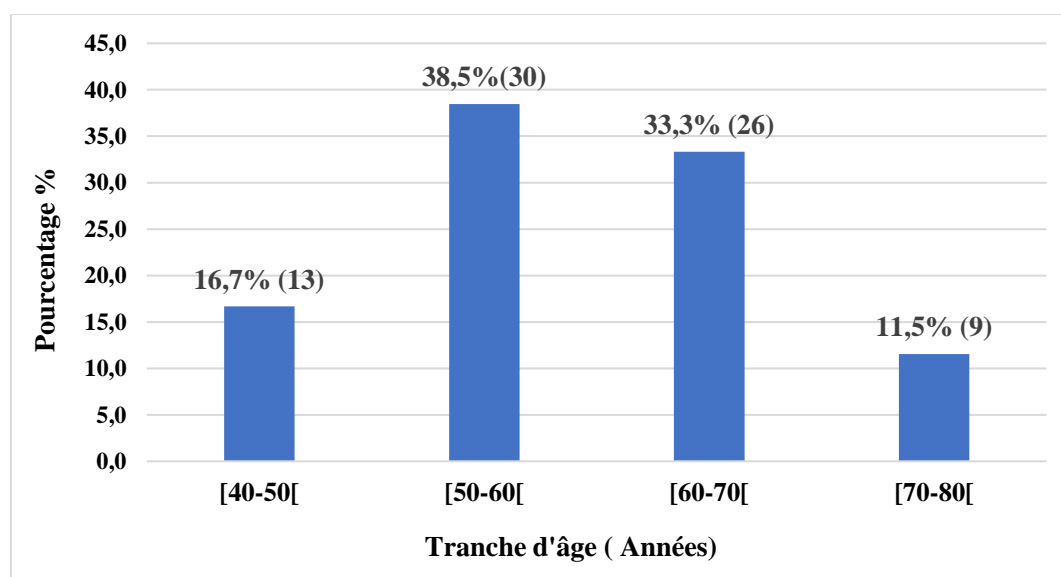


Figure n° 59 : Répartition de la population d'étude selon âge, n=78, () nombre de sujets.

3.1.2. Répartition de la population selon le motif de consultation

Seulement 5% des patients ont consulté pour motif de douleurs, les motifs pour la prothèse maxillaire les plus répandus étaient une prothèse ancienne 39,7%, instable 28,2% et fracturée (brisée) 27% (Fig. n°60).

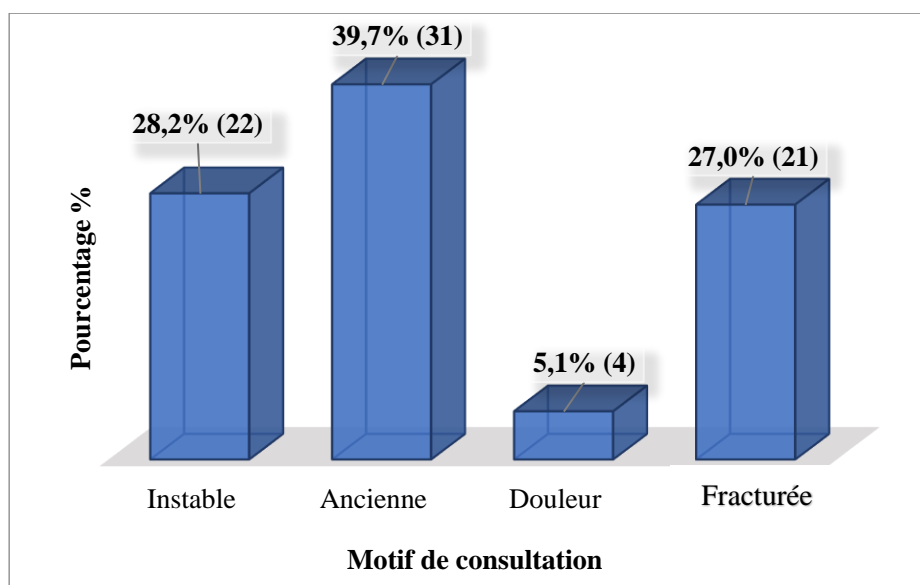


Figure n° 60: Répartition de la population selon le motif de consultation , n=78, () nombre de sujets.

3.1.3. Étude de la pathologie de la stomatite prothétique

3.1.3.1. Prévalence de la stomatite prothétique

Dans cette étude, la prévalence de la stomatite prothétique chez l'édenté total appareillé était de 32,8% (Fig n°61).

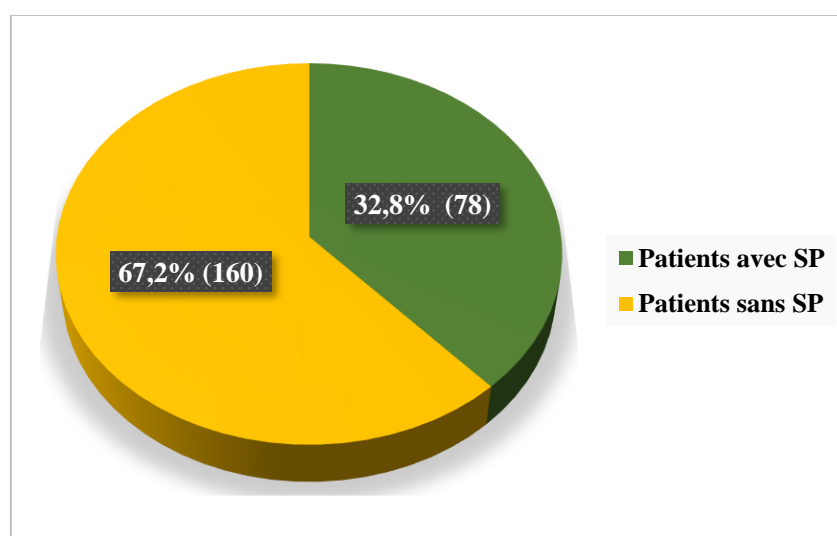


Figure n°61: La prévalence de la stomatite prothétique (SP) dans notre étude.
n= cas de stomatite prothétique /échantillon global (nombre de patients appareillés)= 78/238.

3.1.3.2. Répartition de la population d'étude selon les caractéristiques cliniques de la stomatite prothétique

Selon la figure, la SP se caractérisait majoritairement par un érythème 74,4 % (Fig. n°62).

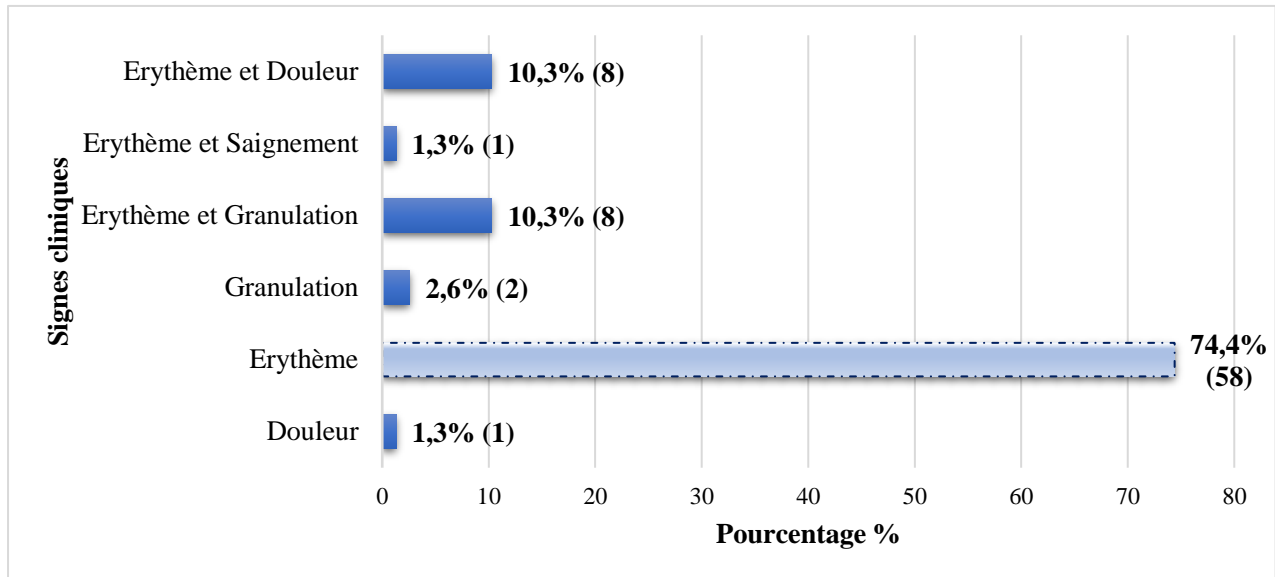


Figure n°62 : Répartition de la population d'étude selon les caractéristiques cliniques de la stomatite prothétique. n=78, () nombre de sujets.

3.1.3.3. Répartition de la population selon le type et le grade de la stomatite prothétique

Parmi la population étudiée, la fréquence de la SP se répartissait comme suit (Fig n° 63):

- la SP de type II grade B correspondait à 40%.
- Près de 40% présentaient une SP de type II grade B.
- 23,1% souffraient d'une SP type I grade A.
- Et 6% une SP type III grade A.

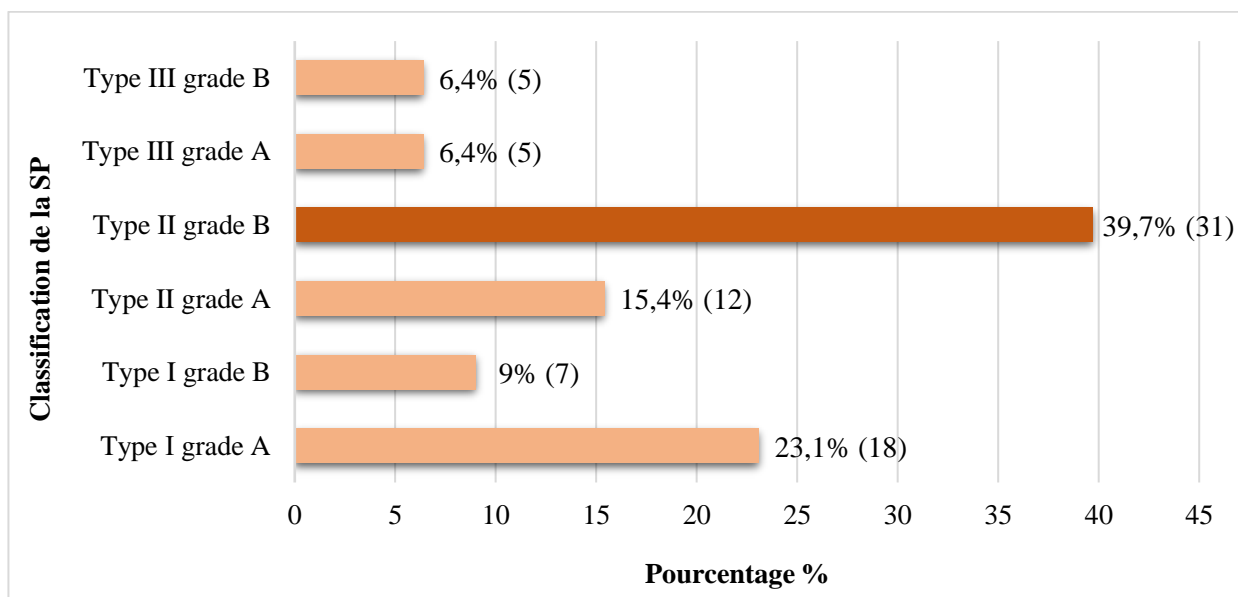


Figure n°63 : Répartition de la population selon le type et le grade de la stomatite prothétique. n=78, () nombre de sujets

3.1.4. Étude des facteurs de risque

3.1.4.1. Répartition de la population selon l'ancienneté des prothèses

La majorité des prothèses 41% datent de 10 à 20 ans, et 9% ont plus de 30 ans (Fig n°64).

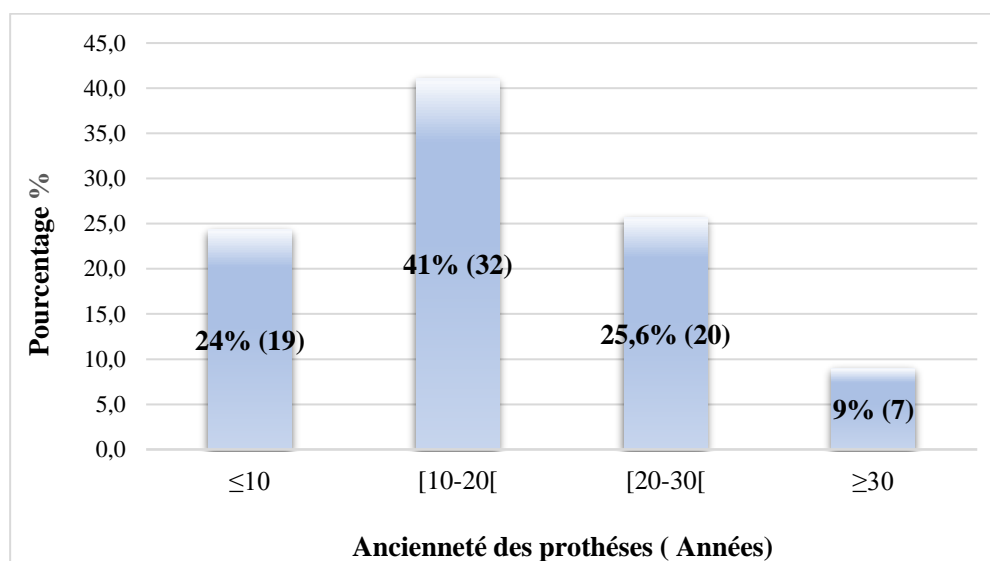


Figure n° 64 : Répartition de la population selon l'ancienneté des prothèses. n=78, () nombre de sujets.

3.1.4.2. Étude de l'hygiène bucco-prothétique

a. Répartition de la population d'étude selon les méthodes de nettoyage des prothèses

Près de Trente-cinq pour cent des patients brossaient leurs prothèses avec l'eau et du savon ou avec l'eau et la pâte dentifrice, et 9 % seulement les trempaient dans un produit désinfectant (exemple : eau javalisée) (Fig. n°65).

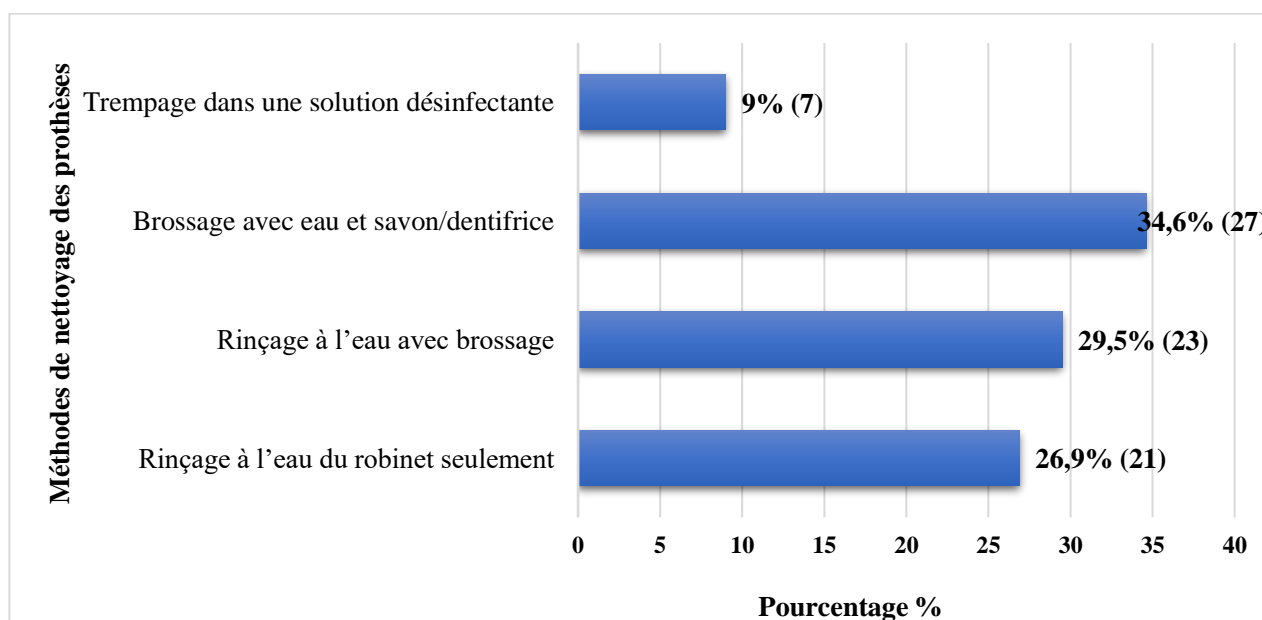


Figure n° 65 : Répartition de la population d'étude selon les méthodes de nettoyage des prothèses, n=78, () nombre de sujets.

b. Répartition de la population d'étude selon la fréquence d'entretien des prothèses

Plus de 69 % des patients brossaient leurs prothèses tous les jours (Fig. n°66).

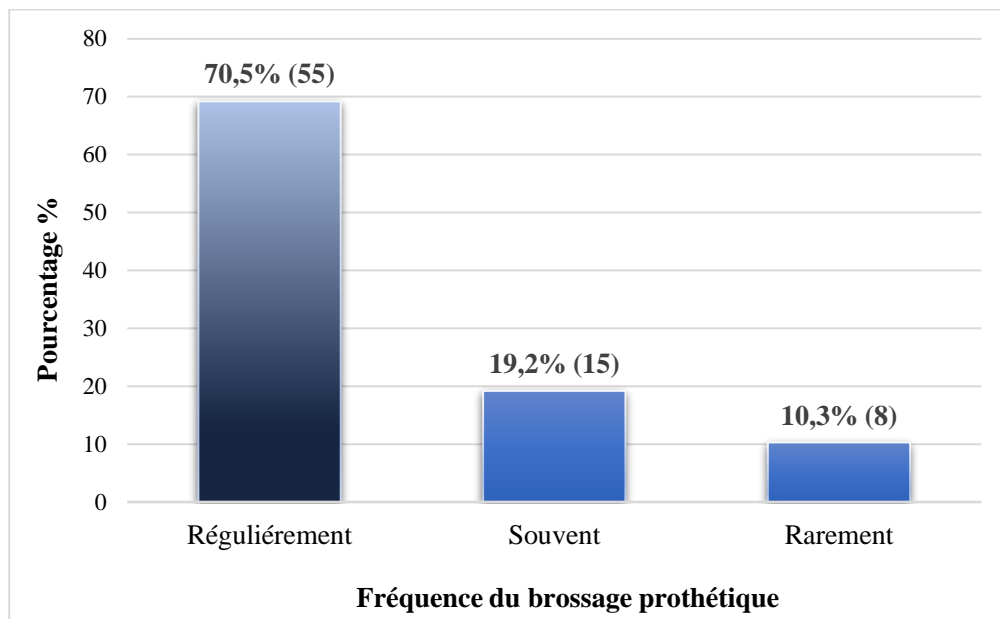


Figure n°66: Répartition de la population d'étude selon la fréquence d'entretien des prothèses, n=78, () nombre de sujets.

c. Répartition de la population d'étude selon le brossage du palais

Seulement 17% des patients brossaient leur palais, contre 83 % qui ne le pratiquaient pas (Fig. n°67).

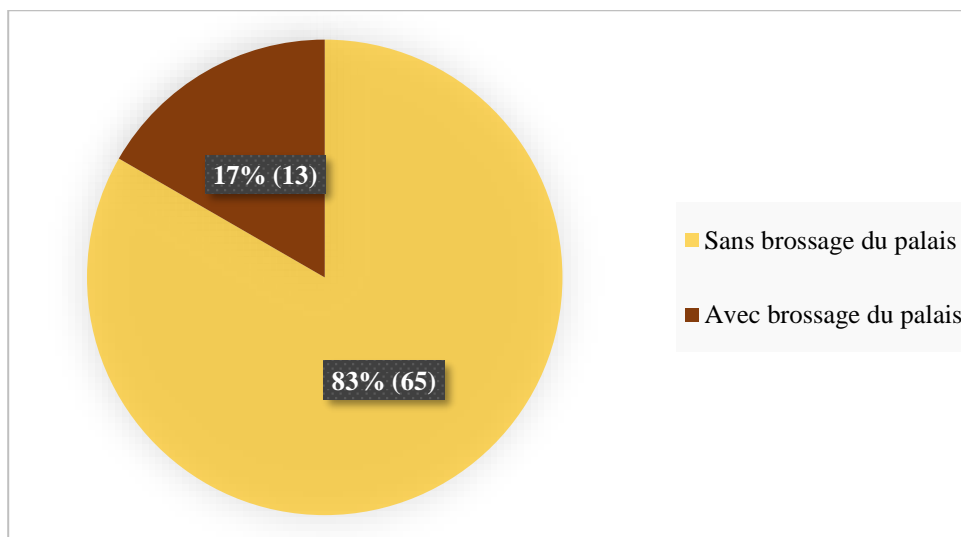


Figure n°67 : Répartition de la population d'étude selon le brossage du palais, n=78 , () nombre de sujets.

3.1.4.3. Répartition de la population selon le port prothétique nocturne

Plus de 60 % des patients gardaient leurs prothèses en bouche la nuit (Fig. n°68).

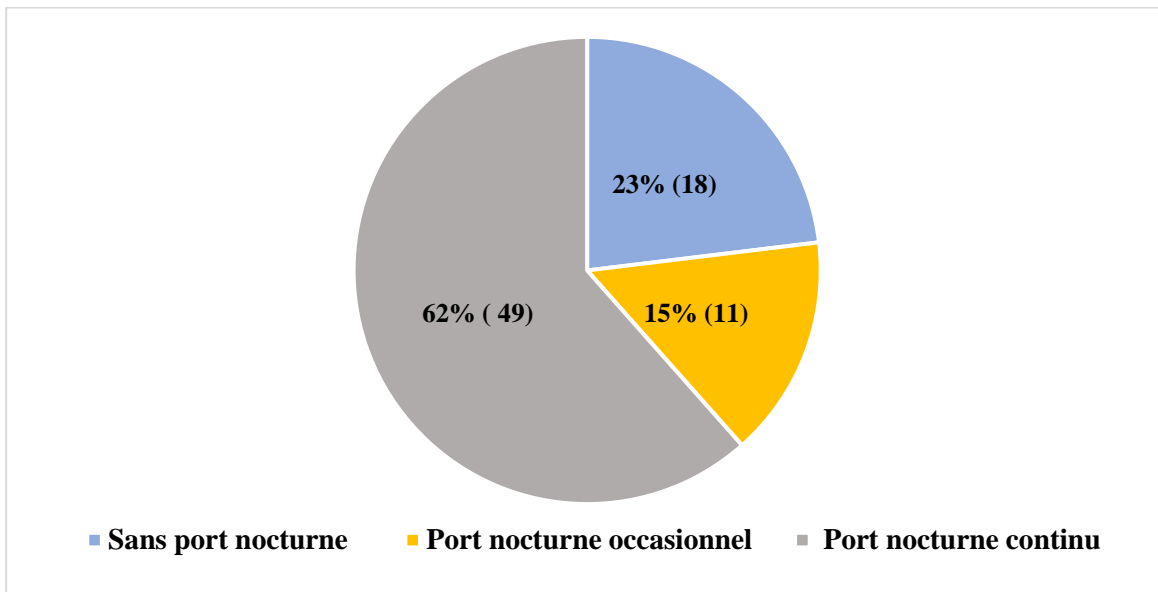


Figure n°68 : Répartition de la population selon le port prothétique nocturne.
n=78, () nombre de sujets.

3.1.4.4. Répartition de la population d'étude selon le type de conservation de la prothèse

La majorité des patients 62,8% conservaient leurs prothèses dans un contenant rempli d'eau seulement, et peu de patients gardaient leurs prothèses au sec 14,1 % (Fig n°69).

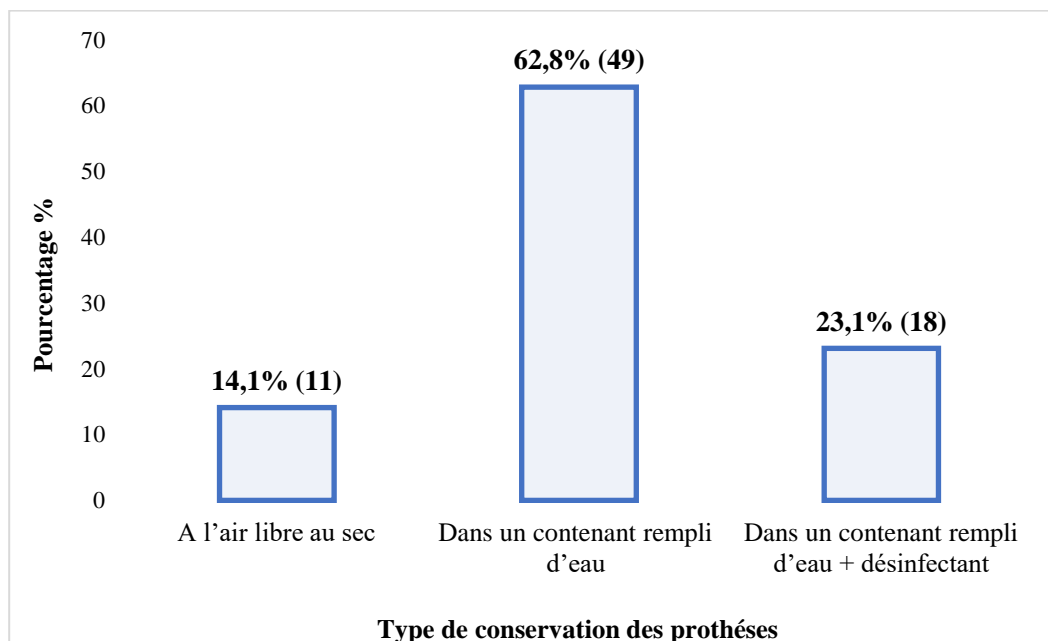


Figure n° 69 : Répartition de la population d'étude selon la conservation de la prothèse.
n=78. () nombre de sujets.

3.1.4.5. Répartition de la population d'étude selon la consommation du tabac

La majorité des sujets masculins étaient non-fumeurs 64% (16 / 25) (Fig n°70).

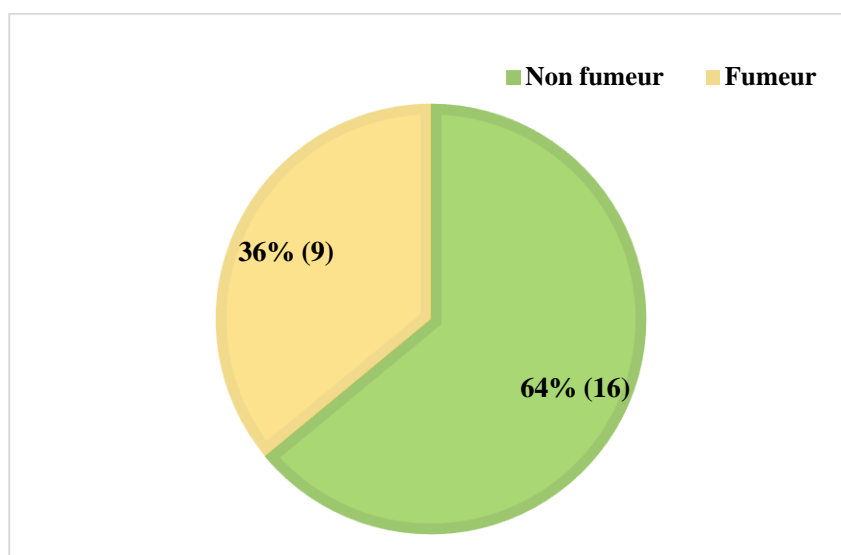


Figure n°70 : Répartition de la population d'étude selon la consommation du tabac.
n=25 ,() nombre de sujets.

3.1.4.6. Étude mycologique

a. Distribution du nombre total de levures retrouvées sur les prothèses maxillaires

Sur les 78 prothèses maxillaires : 59 des prélèvements contenaient des filaments mycéliens ou des pseudo-filaments à l'examen direct (examen direct et culture positifs) ,12 prélèvements présentaient de faux négatifs à l'examen direct alors que les cultures étaient positives, et 7 prélèvements étaient sans culture fongique (examen direct et culture négatifs) (Tableau n°XX).

Un total de 71 prélèvements mycologiques soit 91% montraient une présence de levures sur les prothèses dentaires contre 9% (7 patients) qui n'en montraient pas (Fig. n°71).

Tableau n°XX : Résultats de l'examen mycologique.

Examen direct / Culture	Positif (n)	Négatif (n)	Total (n)	Pourcentage %
Positive (n)	59	12	71	91%
Négative (n)	0	07	7	9%
Total	59	19	78	100

(n) : nombre d'échantillon

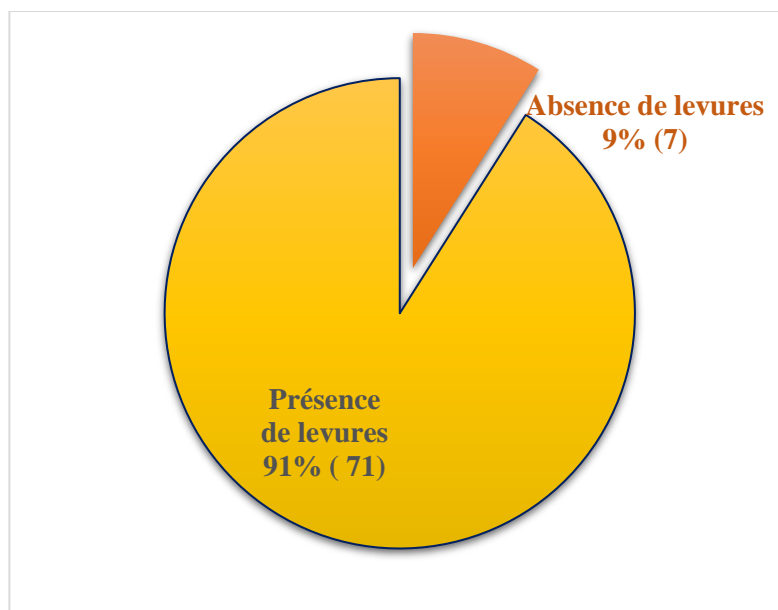


Figure n°71 : Distribution du nombre total de levures retrouvées sur les prothèses maxillaires des patients atteints de stomatite prothétique. n=78, () nombre d'échantillons.

b. Distribution du nombre d'espèces de *Candida* retrouvées sur les prothèses maxillaires

Un total de 70% des prothèses maxillaires étaient contaminées par des *Candida* mono-espèces (une seule espèce), tandis que le reste des prothèses 27% comportaient une association de souches *Candida* (pluri-espèces) (Fig. n°72).

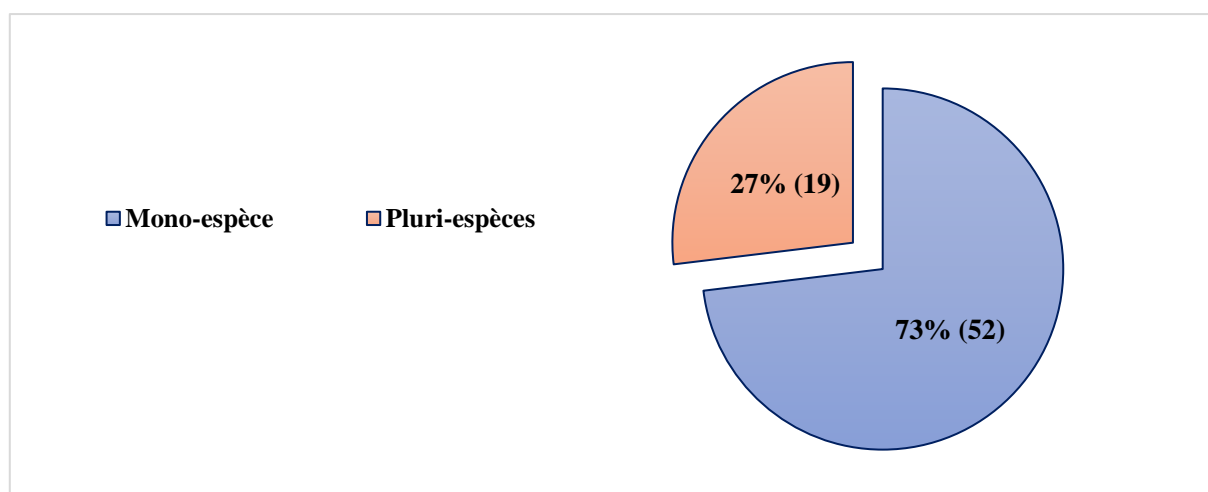


Figure n°72 : Distribution des espèces *Candida* en souches mono-espèce et pluri-espèces isolées des prothèses maxillaires. n= 71, () nombre d'échantillon.

c. Répartition de la population d'étude selon le type d'espèce *Candida*

Sur les 71 des cas de stomatites prothétiques, le *Candida albicans* représentait l'agent responsable le plus fréquent dans 59,1% (n=42) seul, et associé aux autres espèces *Candida sp* dans 21,1%, suivi du *Candida glabrata* retrouvé dans 4,2% (n=3) seul, et associé aux autres espèces *Candida sp* dans 25,3%, et enfin du *Candida tropicalis* isolé dans 9,9% seul (n=7), et associé aux autres espèces *Candida* dans 12,6% (Fig n°73).

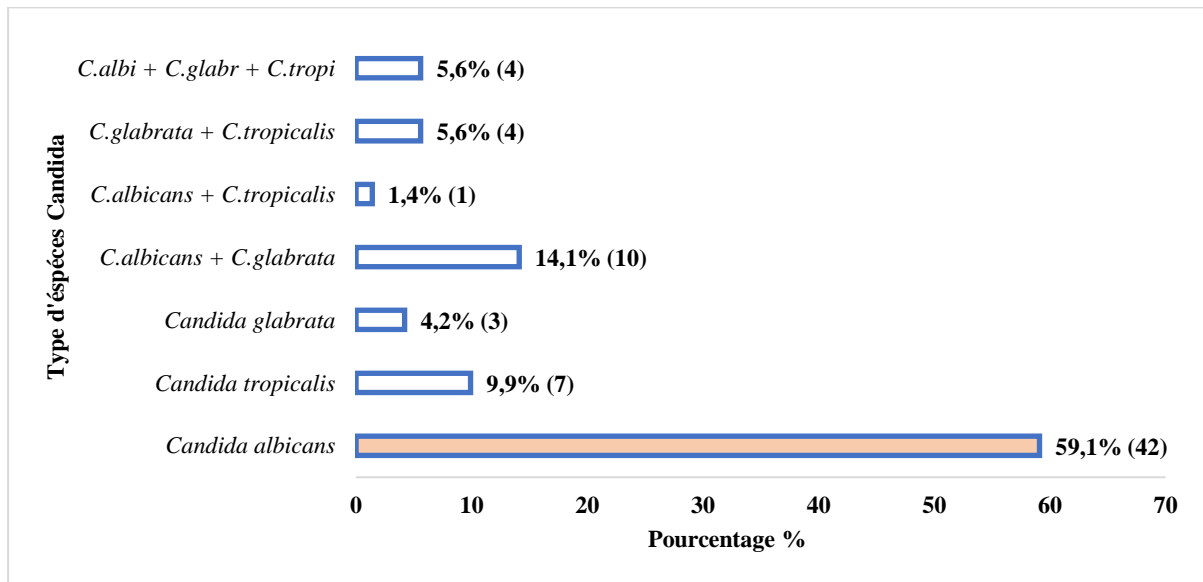


Figure n°73 : Fréquence des espèces de levures isolées des prothèses maxillaires des patients atteints de stomatite prothétique. n= 71, () nombre d'échantillon

L'association la plus fréquente impliquait deux types d'espèces : le *Candida albicans* et *Candida glabrata* retrouvée dans 52,6% parmi les souches pluri-espèces isolées des prothèses, *Candida albicans* et *Candida tropicalis* étaient isolée dans 5,2%, *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* étaient identifiées dans 21,1%. Une contamination par une association de trois espèces *C.albicans*, *C.glabrata* et *C.tropicalis* résultait de cette étude à 21,1% (Fig n°74). *Candida albicans* est la seule souche isolée chez 42 des 71 personnes (59,1%) atteintes de stomatite prothétique, *Candida glabrata* a été trouvé chez 3 (4,2%) . Parmi les trois autres patients, nous avons isolé *C. glabrata* et *C. tropicalis*, *C. albicans* et *C. tropicalis*, et enfin *C. glabrata*, *C. albicans* et *C. tropicalis*..

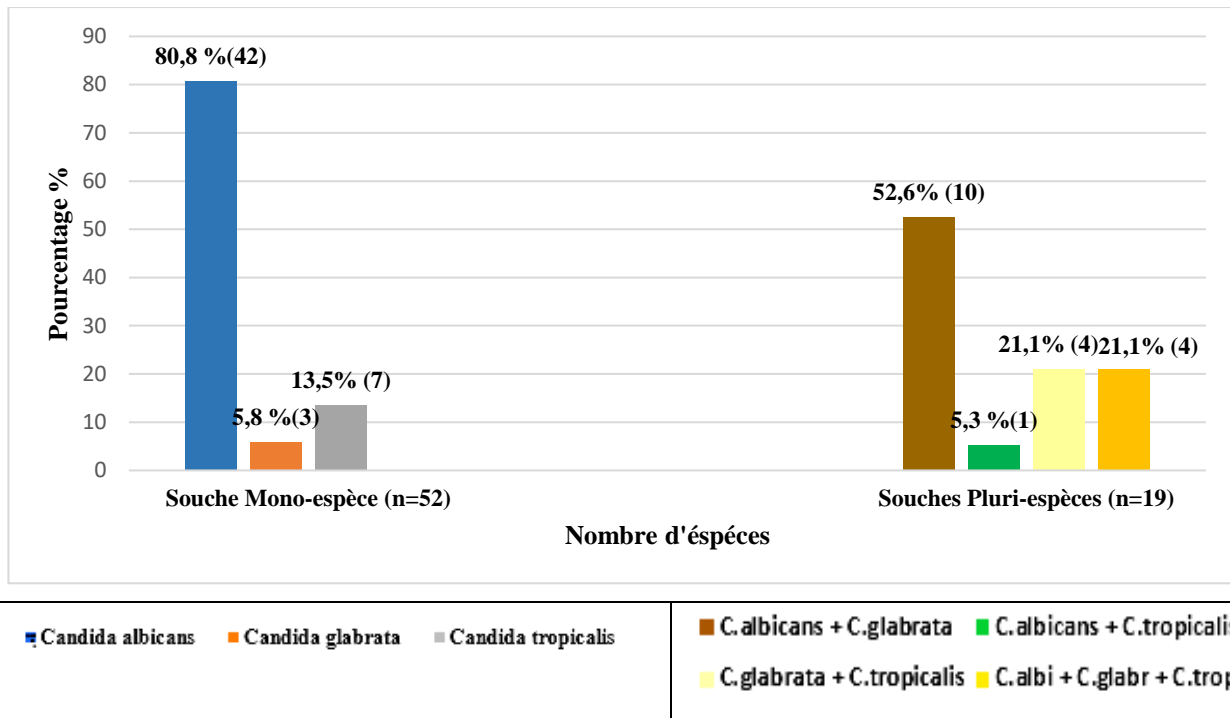


Figure n°74: Fréquence des espèces de *Candida* seul et associé isolées chez les sujets atteints de stomatite. n= 71, (n) nombre d'échantillon.

3.1.4.7. Etude de la relation entre le nombre d'espèces et l'intensité clinique de la stomatite prothétique

La répartition du type de la stomatite prothétique était fréquente en mono-espèce par rapport au pluri-espèces et l'étude de l'association est à la limite de la signification (Tableau n°XXI).

Une prédominance des *Candida* mono-espèces était constatée dans les différents types cliniques de la SP et l'étude de l'association était à l'approche de la signification $p = 0,08$ ($p < 0,05$ était retenue comme significatif) (Fig n° 75).

Tableau n° XXI: Fréquence d'isolement des espèces de *Candida* (seuls ou associées) isolées des frottis des prothèses de sujets atteints de stomatite prothétique.

	Intensité clinique de la stomatite prothétique			Total	p
	SP type I	SP type II	SP type III		
	32,4%	53,5%	14,1%	100% (71)	
	(n=23)	(n=38)	(n=10)		
% (n) sujets avec <i>Candida</i>					
- Mono- espèces	18,3% (13)	43,7% (31)	11,2% (8)	73,2% (52)	0,08
- Pluri- espèces	14,1% (10)	9,9% (7)	2,8% (2)	26,8% (19)	Non significatif

p : seuil de signification test de khi-deux. Signification < 0,05

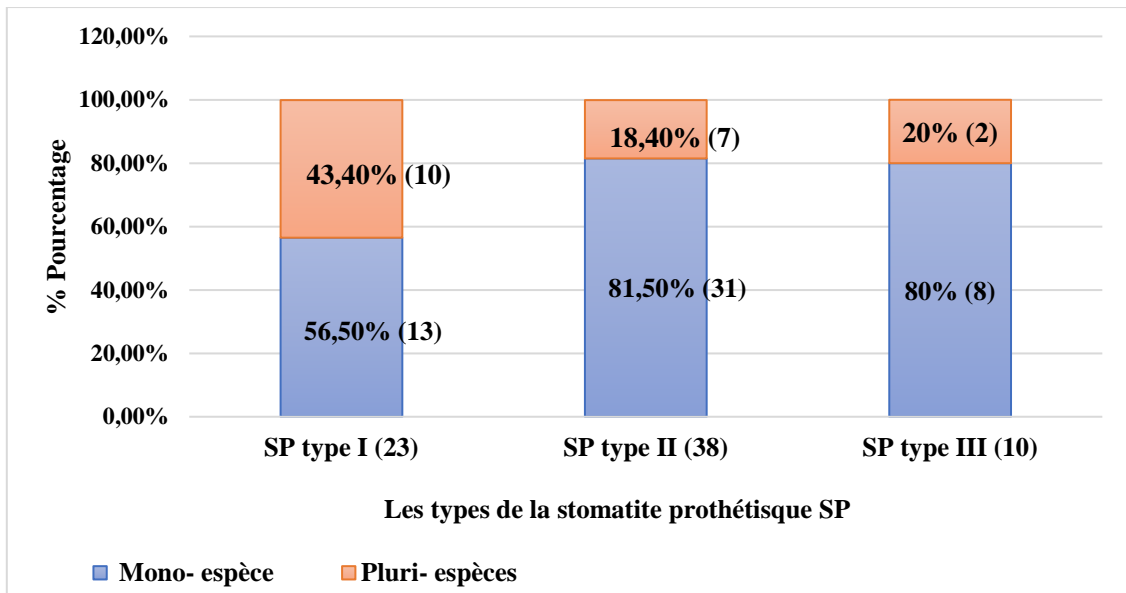


Figure n°75 : Graphique illustrant la relation entre le nombre des espèces de levures identifiées et l'intensité clinique de la stomatite prothétique selon Newton. Chaque type de la lésion représente la proportion de patients chez lesquels les espèces pures ou associées de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* étaient isolées. $p=0,08$. $n=71$. () : nombre .

3.1.4.8. Résultat de l'indication du traitement prothétique

Tous les patients ont reçu une nouvelle construction prothétique bimaxillaire (Fig n°76).

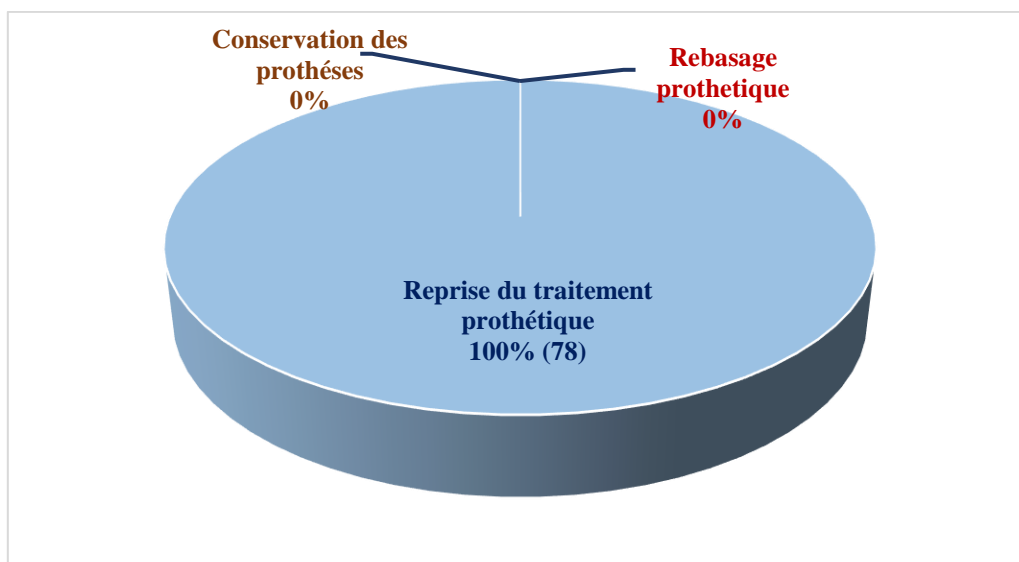


Figure n° 76: Résultat de l'indication du traitement prothétique. $n=78$. () : nombre .

3.2. Résultats de l'Étude Expérimentale

3.2.1. Partie 1 : Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles étudiées

3.2.1.1. Résultats de l'Extraction des huiles essentielles.

Les huiles essentielles recueillies par la méthode d'hydro distillation des parties aériennes du *Thymus fontanesii* (Thym) et des boutons floraux de *Syzygium aromanticum* (Girofle) sont d'apparence liquide, jaune et transparente respectivement, caractérisées par une forte odeur (Fig n°77).

La teneur en huiles essentielles des deux plantes était suffisante, elle varie de $4,31\% \pm 1,29$ pour l'huile de thym et de $3,68 \pm 0,72$ pour l'huile de girofle (Tableau n°XXII).

Tableau n°XXII : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites.

	Huile essentielle <i>Thymus fontanesii</i> (Parties aériennes)	Huile essentielle <i>Syzygium aromanticum</i> (Boutons floraux)
Aspect	Liquide limpide	Liquide limpide
Couleur	Jaune	Transparente
Odeur	Aromatique, acre	Aromatique, forte
Saveur	Très piquante	Piquante
Solubilité	Liposoluble Soluble dans les solvants organiques usuels	Liposoluble Soluble dans les solvants organiques usuels
Rendement Moyen (%)	$4,31 \pm 1,29$	$3,68 \pm 0,72$



Figure n°77: Huiles essentielle de girofle et de thym. Iconographie personnelle – Laboratoire de Produits Naturels Faculté de Biologie de Tlemcen.

3.2.1.2. Résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles

a. L'huile essentielle des parties aériennes de *Thymus fontanesii*

Au total, 27 composés étaient identifiés (Tableau n°XXIII), représentant 99,6 % de la composition totale dominée par les monoterpènes oxygénés (71,0 %). L'huile était caractérisée par une forte teneur en carvacrol (56,3%) avec d'autres monoterpènes oxygénés en quantités appréciables : thymol (10,7%) et le linalol (3,1%). La fraction des hydrocarbures monoterpéniques (27,6 %) était principalement représentée par γ -terpinène (11,0 %), p-cymène (10,5 %), myrcène (1,5 %) et α -pinène (1,5 %). Les hydrocarbures de sesquiterpène (0,6%) étaient bien représentés par (E)- β -caryophyllène (0,6%) et δ -cadinène (tr). L'oxyde de caryophyllène (0,2 %) était le seul sesquiterpène oxygéné présent en très faible quantité.

En conclusion l'huile essentielle de notre espèce de Thym est à chémotype carvacrol.

Tableau n° XXIII : Composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes de *Thymus fontanesii* (Thym) obtenue par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse.

Constituants ^[a]	RI ^[b]	RI ^[c]	%
1. α -Thujène	921	1022	0,7
2. α -Pinène	929	1020	1,5
3. Camphène	942	1069	0,1
4. 1-Octen-3-ol	959	1452	0,1
5. 3-Octanone	963	1258	0,1
6. β -Pinène	969	1114	0,1
7. Myrcène	979	1164	1,5
8. α -Phellandrène	996	1169	0,1
9. δ -3-Carene	1004	1152	0,1
10. α -Terpinène	1008	1185	1,3
11. Para-Cymène	1011	1276	10,5
12. Limonène*	1020	1204	0,6
13. 1,8-Cineole*	1020	1214	0,2
14. (E)- β -Ocimène	1035	1253	Tr
15. γ-Terpinène	1048	1250	11,0
16. Hydrate de trans-sabinène	1052	1466	0,1
17. Terpinolène	1077	1287	0,1
18. Linalol	1083	1551	3,1
19. Bornéol	1148	1704	0,1
20. Terpinéol-4	1160	1605	0,3
21. α -Terpinéol	1170	1700	0,1
22. Oxyde de méthyle de carvacryle	1224	1608	0,1
23. Thymol	1267	2194	10,7
24. Carvacrol	1279	2224	56,3
25. (E)- β -Caryophyllène	1415	1597	0,6
26. δ -cadinène	1512	1757	Tr
27. Oxyde de Caryophyllène	1566	1981	0,2
Monoterpènes oxygénés			71,0
Monoterpènes hydrocarbonés			27,6
Sesquiterpènes oxygénés			0,2
Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,6
Autres			0,2
Total (%)			99,6

^[a] L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)).

^[b] RI et ^[c] RI : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire.

Tr : trace.

b. L'huile essentielle des boutons floraux de *Syzygium aromaticum*

Au total, 16 composés étaient identifiés (Tableau n°XXIV), dont deux phénylpropanoïdes, atteignant 99,8% de la composition globale, et désignant l'eugénol comme composé majoritaire (60,3 %). L'acétate d'eugényle (8,6 %) était l'autre phénylpropanoïde présent en teneur appréciable. (E)- β -caryophyllène (26,6%) était le sesquiterpène oxygéné présent en quantité significative, suivi de α -humulène (2,3%). L'oxyde de caryophyllène (0,3 %) et le *t*-muurolol (Tr) étaient les seuls sesquiterpènes oxygénés présents en très faible quantité.

Tableau n° XXIV : Composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle des boutons floraux de *Syzygium aromaticum*.(Girofle) obtenue par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse.

Constituants ^[a]	RI ^[b]	RI ^[c]	(%)
1. α -Thujène	1167	1781	0,1
2. α -Pinène	1210	1786	0,6
3. Carvone	1214	1723	0,1
4. α -Terpinène-7-al	1255	1794	Tr
5. γ -Terpinène-7-al	1261	1800	0,3
6. Carvacrol	1275	2223	0,1
7. Eugenol	1330	2177	60,3
8. α -Copaène	1374	1492	0,2
9. (E) -β-Caryophyllène	1417	1600	26,6
10. α -Humulène	1448	1670	2,3
11. Germacrène D	1473	1708	0,1
12. Acétate d'eugényle	1486	2265	8,6
13. (E)- α -Farnesène	1494	1737	0,1
14. δ -Cadinène	1512	1751	0,1
15. Oxyde de Caryophyllène	1567	1982	0,3
16. <i>t</i> -Muurolol	1617	2177	Tr
Monoterpènes oxygénés			0,7
Monoterpènes hydrocarbonés			0,5
Sesquiterpènes oxygénés			0,3
Sesquiterpènes hydrocarbonés			29,4
Phénylpropanoïdes			68,9
Total (%)			99,8

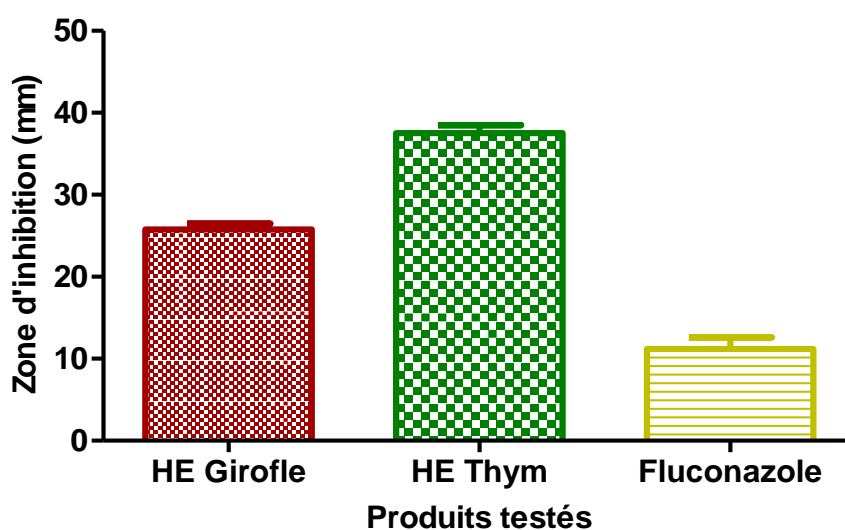
^[a] L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1).
^[b] IR et ^[c] IR: Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP-1) et sur colonne polaire (BP-20).
Tr: Traces.

3.2.1.3. Résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles et de leur combinaison.

d. Résultats de la méthode de diffusion sur disques : Méthode de l'aromatogramme

Les huiles essentielles de *T. fontanesii* et de *S. aromanticum* étaient actives contre toutes les souches testées, avec un diamètre moyen de la zone d'inhibition (IZ) de l'huile de thym de $49,08 \pm 6,8$ mm, de l'huile de *S. aromanticum* (IZ) de $31,4 \pm 3,04$ mm, contre un diamètre (IZ) de $20,3 \pm 9,7$ mm pour le Fluconazole (Fig. n°78).

L'activité antifongique de l'huile de *Thymus fontanesii* s'est avérée meilleure que celle de l'huile du girofle, qui était plus active que celle du Fluconazole (témoin positif).



Comparaison	p value	Signification
Girofle versus Fluconazole	$p < 0,0001$	Très significatif
Girofle versus Thym	$p < 0,0001$	Très significatif
Thym versus Fluconazole	$p < 0,0001$	Très significatif

Figure n° 78 : Comparaison des diamètres de la zone d'inhibition (IZ) de chacune des huiles de Girofle et de Thym avec le Fluconazole, obtenues par méthode de diffusion sur disque (n= 06) .

b. Résultats des concentrations minimales inhibitrices et fongicides par la méthode de micro dilution sur milieu liquide

La comparaison de l'absorbance des milieux fongiques additionnés aux différentes concentrations de l'HE de Thym avec celle du milieu témoin (concentration = $0 \mu\text{L/mL}$), a montré une diminution progressive de la croissance fongique au fur et à mesure que la concentration du thym augmentait avec une différence statistiquement significative (Fig n°79 A). Ceci a été confirmé par l'étude du pourcentage de la croissance fongique comparé à l'inoculum (Fig n°79 B), déterminant une

inhibition microbienne dans les puits, visible à l'œil nu, par une **CMI** à la dose **0,125µL/mL** avec un résultat très significatif (cf. Tableau n°XXV)

L'augmentation de la concentration de l'HE de **Thym** à 0,25 µL/mL aboutissait à une mort totale des cellules fongiques puisque la gélose ne montrait aucune colonie à cette dose avec une nette différence significative, ce qui nous permet de la fixer comme Concentration Minimale Fongicide **CMF = 0,25 µL/mL** (Fig. n°79).

L'échantillon témoin contenant du DMSO n'a montré aucun effet d'inhibition sur les espèces de *Candida* à la concentration utilisée.

La Figure n°80 montre l'effet des différentes concentrations de l'huile de Girofle de 0 à 1µL/mL sur la croissance des levures dans les puits d'une plaque 96 puits en polystyrène. La turbidité du milieu de culture était contrôlée, dans tous les puits, représentant une absorbance à 530 nm de 0,12 à 0,15, n =7 en expériences indépendantes. Les données de chacune de ces expériences indépendantes étaient normalisées par rapport à la moyenne des contrôles positifs de l'expérience, permettant ainsi à la fois d'estimer la variabilité des résultats au sein de chaque condition par rapport au contrôle et d'éviter le biais de la variabilité entre les expériences.

La réduction de la croissance fongique représentée par l'absorbance des milieux additionnés à l'**HE de Girofle** était aussi dépendante des concentrations, où elle était significative pour la première concentration employée 0,125 µL/mL ; une inhibition visible dans les puits était notée à la dose de **0,5 µL/mL = CMI**, pour atteindre une létalité totale des levures à la concentration **1µL/mL = CMF** avec un résultat statistiquement très significatif (Fig. n°80) ((cf. Tableau n°XXVI).

Le taux de l'absorbance des puits avait régressé d'une manière très significative à partir de la concentration des HEs combinées de **Girofle /Thym** de **0,25 /0,063 µL/mL** pour laquelle la **CMI** était attribuée, jusqu'à absence totale de toute survie des levures à la dose **CMF= 0,5 /0,125µL/mL** (Fig. n°81) (Tableau n°XXVII).

Ces résultats montrent de manière concluante le potentiel antifongique des huiles de Thym et de Girofle et de leur combinaison, puisqu'elles sont efficaces selon une relation dose-dépendante : au fur et à mesure que la concentration des HEs dans les puits augmente, le nombre de colonies se trouve progressivement diminué jusqu'à atteindre la concentration maximale entraînant leur élimination totale (cf. Tableau n°XXVIII).

Cela s'explique par leur **caractère fongicide** des huiles essentielles de Thym et de Girofle contre le *Candida albicans*, qui a été retrouvé par l'équation qui définit l'effet microbicide d'un produit testé. (Effet fongicide ≤ 4)

$$\text{Thym : } \frac{\text{CMF}}{\text{CMI}} = \frac{0,250}{0,125} = \mathbf{2} \qquad \text{Girofle : } \frac{\text{CMF}}{\text{CMI}} = \frac{0,5}{1} = \mathbf{0,5}$$

Le calcul de l'Indice de la Concentration Inhibitrice Fractionnaire **FICI** (Fractional inhibitory concentration index) permet d'évaluer l'effet antifongique combinatoire des deux HEs, et représente la somme des Concentrations Inhibitrices Fractionnaires (FIC : Fractional Inhibitory Concentration) des deux huiles, et est comme suit :

- 1^{ère} huile essentielle "Thym" : $\text{FIC}_{\text{thym}} = \frac{\text{CMI combinaison}}{\text{CMI seule}} = \frac{0,063}{0,125} = 0,5$
- 2^{ème} huile essentielle "Girofle" ; $\text{FIC}_{\text{girofle}} = \frac{\text{CMI combinaison}}{\text{CMI seule}} = \frac{0,25}{0,5} = 0,5$

$$\mathbf{FICI} = \text{FIC}_{1\text{ère HE}} + \text{FIC}_{2\text{ème HE}} = \mathbf{1} \quad \rightarrow \quad 1 \geq \text{FICI} > 0,5 \rightarrow \mathbf{\text{Combinaison Additive}}$$

L'effet antifongique additif de ces deux huiles contre le *C.albicans* a été obtenu avec un volume de Thym et un demi volume de Girofle.

Les résultats montrent un pouvoir antifongique de la combinaison des huiles, en plus de leur action antifongique individuelle, leur association offre une action antifongique supérieure, où les concentrations de la combinaison des HEs se trouvent réduite d'un pallier.

La CMI du mélange était obtenu à une concentration inférieure d'un pallier des CMI additionnées de d'un volume de 0,625 μL , avec une valeur 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'HE de girofle et de 0,125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'HE de thym.

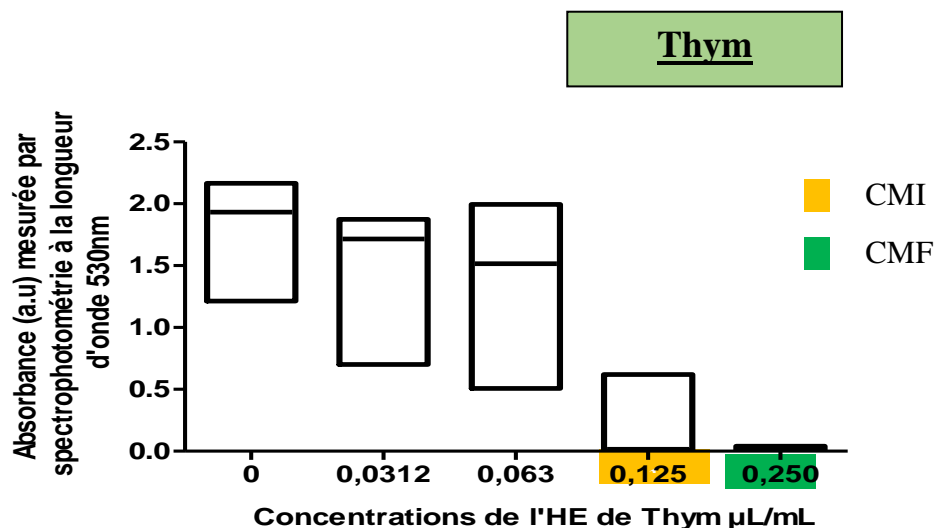


Figure n°79(A): Effet du *Thymus fontanesii* sur la croissance des *Candida albicans* cliniques et référencées, évalué par turbidimétrie sur un spectrophotomètre dans des microplaques de 96 puits. Médiane et valeurs extrêmes, n=7, expériences dupliquées 2 fois.

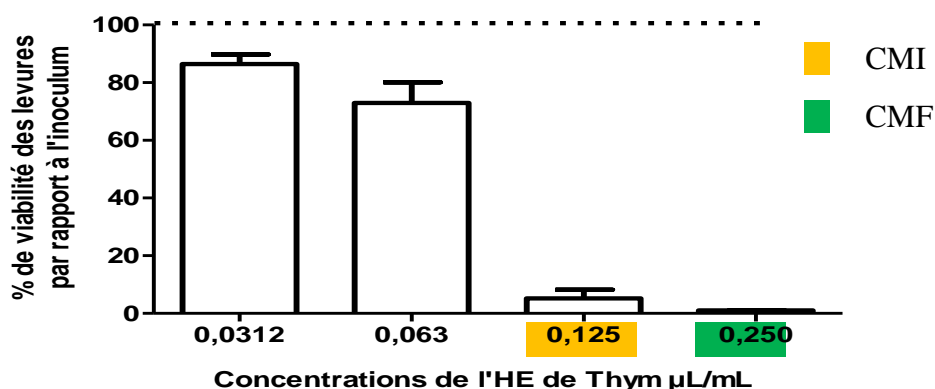


Figure n°79 (B): Effet du *Thymus fontanesii* sur la croissance des *Candida albicans* cliniques et référencées, évaluée par turbidimétrie. La ligne en pointillés indique la valeur de contrôle normalisée 100% Moyenne \pm écart type, n= 7, expériences dupliquées 2 fois.

Tableau n°XXV : Comparaison du *p* value de l'effet du thym sur la croissance les *Candida albicans*

Comparaison	<i>P</i> value	Signification	Comparaison	<i>P</i> value	Signification
0 versus 0,0312	0,0018	Très significatif	0,0312 versus 0,125	< 0,0001	Très significatif
0 versus 0,063	0,0030	Très significatif	0,0312 versus 0,250	< 0,0001	Très significatif
0 versus 0,125	< 0,0001	Très significatif	0,063 versus 0,125	< 0,0001	Très significatif
0 versus 0,250	< 0,0001	Très significatif	0,063 versus 0,250	< 0,0001	Très significatif
0,0312 versus 0,063	0,4341	Non significatif	0,125 versus 0,250	0,8063	Non significatif

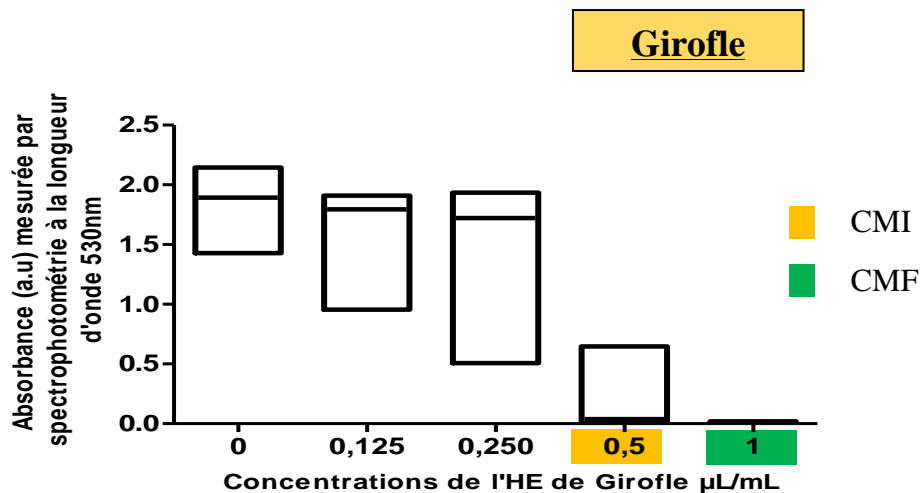


Figure n°80 (A): Croissance des levures évaluée après 24h de culture, par turbidimétrie dans un bouillon de Sabouraud ensemencé par *Candida albicans* cliniques et référencées, dans différentes concentrations de *Syzygium aromanticum*, n=7, (volume total par puit: 300µL), expériences dupliquées 2 fois.

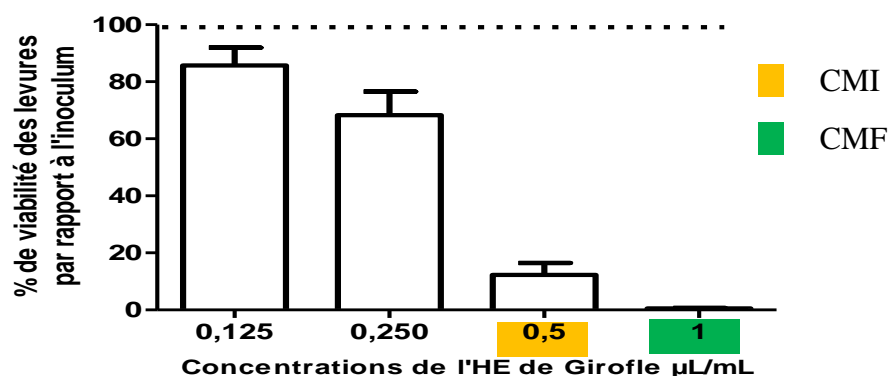


Figure n°80 (B): Effet du *Syzygium aromanticum* sur la croissance des *Candida albicans* cliniques et référencées, évaluée par turbidimétrie sur un spectrophotomètre dans des microplaques de 96 puits. La ligne en pointillés indique la valeur de contrôle normalisée 100% . Moyenne ± écart type, n= 7, expériences dupliquées 2 fois.

Tableau n°XXVI : Comparaison du *p* value de l'effet du girofle sur la croissance les *Candida albicans*

<u>Comparaison</u>	<u>p value</u>	<u>Signification</u>	<u>Comparaison</u>	<u>p value</u>	<u>Signification</u>
0 versus 0,125	0,0018	Significatif	0,125 versus 0,5	< 0,0001	Très significatif
0 versus 0,250	0,003	Significatif	0,125 versus 1	< 0,0001	Très significatif
0 versus 0,5	< 0,0001	Très significatif	0,250 versus 0,5	< 0,0001	Très significatif
0 versus 1	< 0,0001	Très significatif	0,250 versus 1	< 0,0001	Très significatif
0,125 versus 0,250	0,4341	Non significatif	0,5 versus 1	0,8063	Non significatif

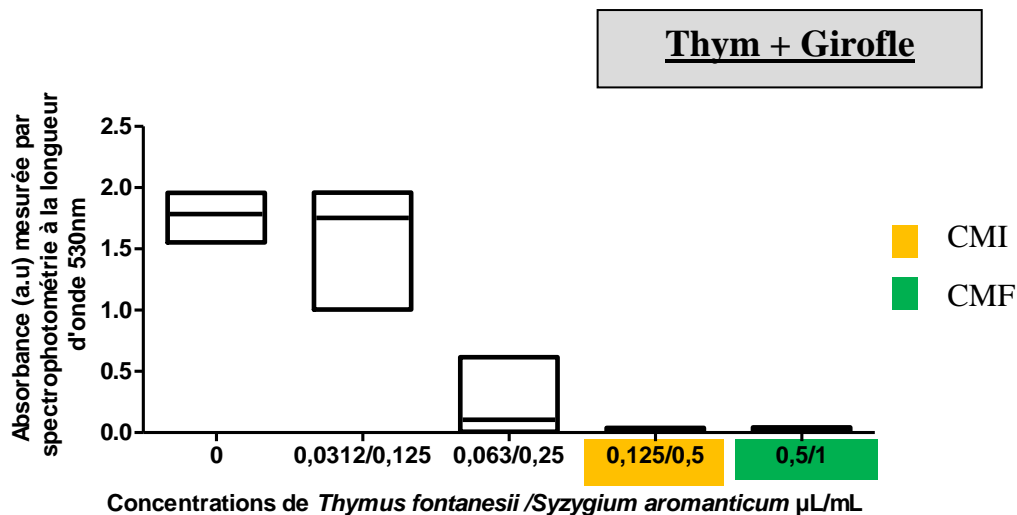


Figure n° 81 (A) : Croissance des levures évaluée après 24h de culture, par turbidimétrie dans un bouillon de Sabouraud ensemencé par *Candida albicans* cliniques et référencées, dans différentes concentrations du mélange des huiles de Girofle et de Thym, n=7, expériences dupliquées 2 fois.

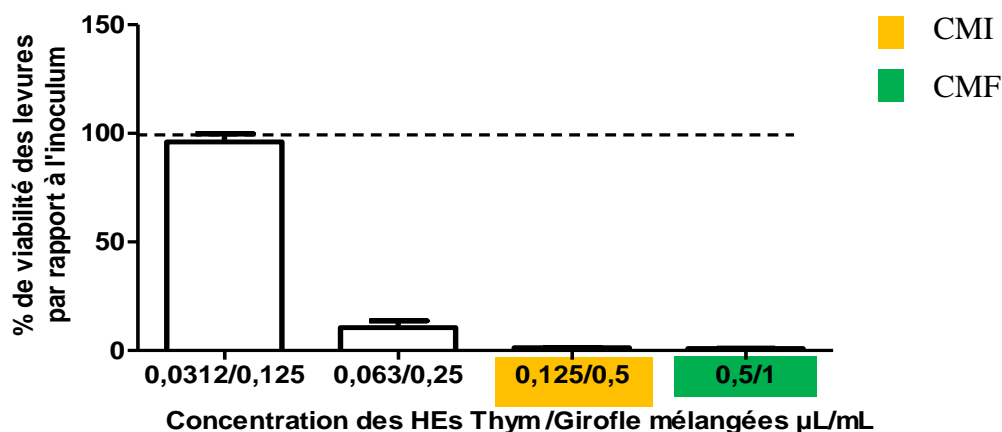


Figure n° 81 (B) : Effet de la combinaison de *Syzygium aromaticum* et de *Thymus fontanesii*. sur la croissance des *Candida albicans* cliniques et référencées, évaluée par turbidimétrie. La ligne en pointillés indique la valeur de contrôle normalisée 100%. Moyenne \pm écart type, n= 7, expériences dupliquées 2 fois.

Tableau n°XXVII : Comparaison du *p* value de l'effet du mélange thym et girofle sur la croissance les *Candida albicans*

Comparaison	<i>p</i> value	Signification	Comparaison	<i>p</i> value	Signification
0 versus 0,125/0,312	0,7107	Non significatif	0,125/0,312 versus 0,5/0,125	< 0,0001	Très significatif
0 versus 0,250/0,063	< 0,0001	Très significatif	0,125/0,312 versus 1/0,25	< 0,0001	Très significatif
0 versus 0,5/0,125	< 0,0001	Très significatif	0,250/0,063 versus 0,5/0,125	0,0011	Très significatif
0 versus 1/0,25	< 0,0001	Très significatif	0,250/0,063 versus 1/0,25	0,0003	Très significatif
0,125/0,312 versus 0,25/0,063	< 0,0001	Non significatif	0,5/0,125 versus 1/0,25	0,1111	Non significatif

Tableau n°XXVIII: Tableau récapitulatif des résultats des CMI et des CMF des huiles essentielles étudiées et de leur combinaison ($\mu\text{L}/\text{mL}$)

HE Thym		HE Girofle		HEs Thym / Girofle	
CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
0,125	0,250	0,5	1	0,063 /0,25	0,125 /0,5

c. Résultats de la concentration semi- inhibitrice

L'efficacité antifongique des HEs est dépendante de leur dose, le pourcentage de la croissance fongique était réduit de moitié en présence de l'HE de Girofle, de l'HE de thym, et de leur combinaison, respectivement à la concentration semi maximale $\text{CMI}_{50} = \text{IC}_{50} = 0,3422\mu\text{L}/\text{mL}$, $0,0657\mu\text{L}/\text{mL}$, et $0,0354\mu\text{L}/\text{mL}$. Les lignes en pointillées horizontales correspondent à 50% de la croissance fongique (Figure n°82).

Nous concluons encore une fois, suite à ce qui a été affirmé précédemment « Page 110 », que le pouvoir fongiotoxique contre *C.albicans* de l'huile de Thym est plus important que celui de l'huile de Girofle, et que l'effet combinatoire des deux huiles est confirmé par une concentration plus faible inhibant 50% de la croissance fongique.

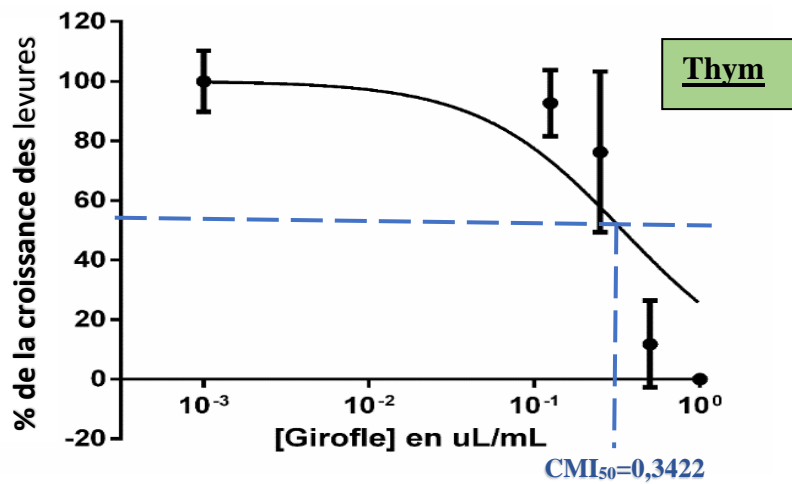


Figure n° 82 (A): Courbe de croissance des *Candida albicans*, cliniques et référencées, en fonction des concentrations de l'huile de Girofle, normalisé à la valeur de contrôle 100%, n=7.

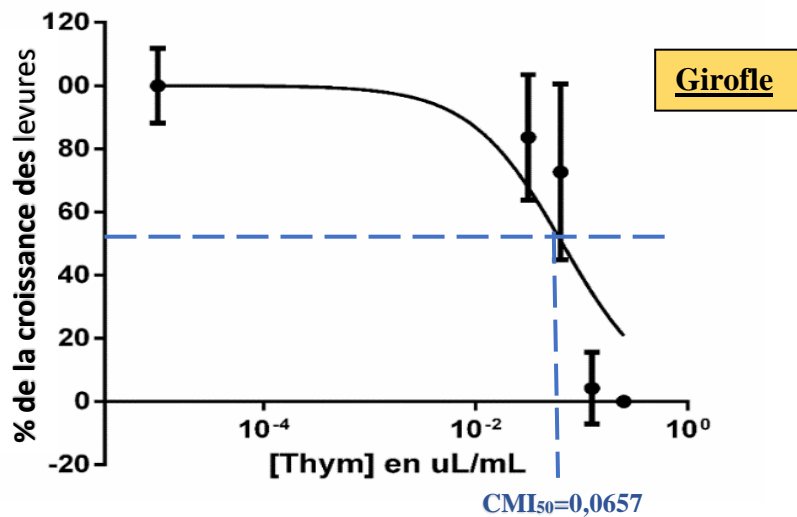


Figure n° 82 (B): Courbe de croissance des *Candida albicans*, cliniques et référencées, en fonction des concentrations de l'huile de Thym, normalisé à la valeur de contrôle 100%, n=7.

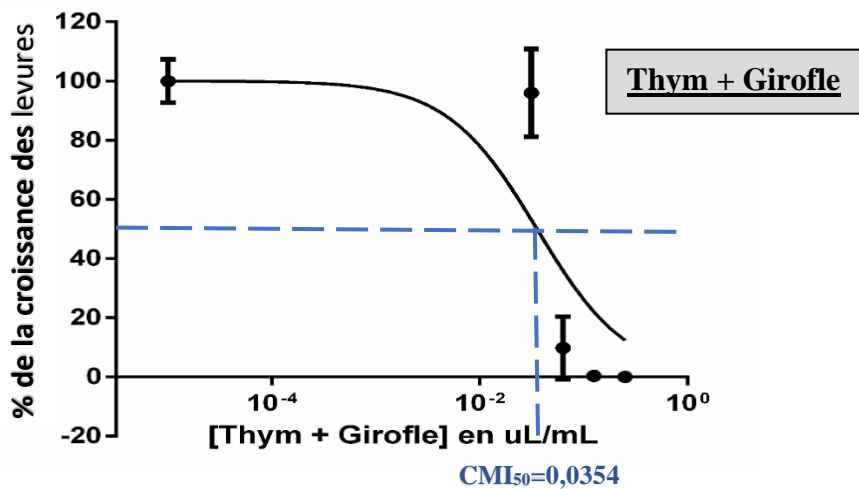


Figure n° 82 (C): Taux de survie des *Candida albicans*, cliniques et référencées, après 24h d'incubation dans différentes concentrations des huiles de Girofle et de Thym mélangées, normalisé à la valeur de contrôle 100%, n=7, intervalle de confiance 95%.

3.2.2. Partie 2 : Résultats de l'efficacité et de la cytotoxicité du gel buccal préparé

3.2.2.1. Contrôle et analyse du produit fini « gel buccal »

Le produit fini dispose des caractéristiques d'un gel à application buccal (Tableau n°XXIX), puisqu'il ne dispose pas d'un fluage très important, et qu'il adhère bien à la spatule (Figure n°83).

Tableau n° XXIX: Caractéristiques macroscopiques du gel buccal

<i>Aspect</i>	Homogène, lisse, sans grumeaux
<i>Consistance</i>	Assez épaisse, facile à étaler
<i>Couleur</i>	Blanche opaque
<i>Odeur</i>	Typique du Thym, agréable
<i>Particularité</i>	Adhérant

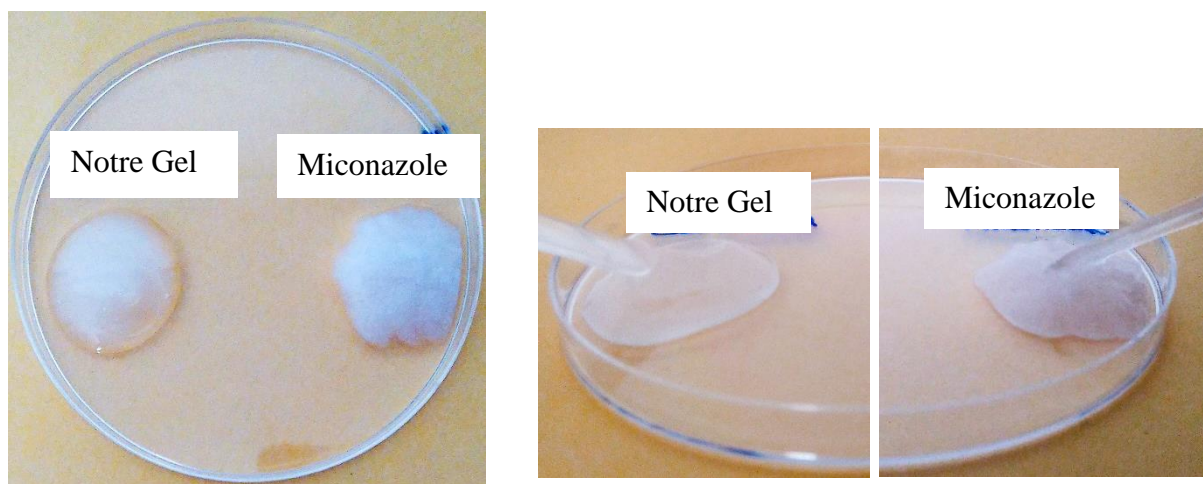


Figure n°83 : Comparaison de l'aspect du gel buccal préparé avec celui du Miconazole (novageneric®)

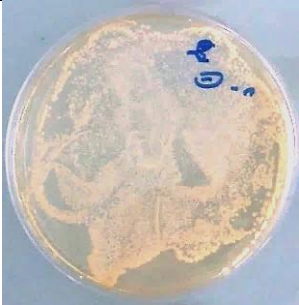
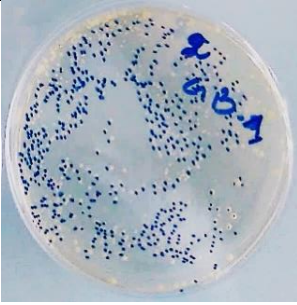






3.2.2.2. Résultats de l'efficacité du gel buccal préparé

a. *Résultats de la comparaison de l'activité antifongique du gel buccal versus Miconazole*

On observe une importante croissance des colonies fongiques non dénombrable dans le puit témoin et celui du gel base (excipient), et une inhibition totale (00 colonies) dans les puits contenant le gel CMF et le Miconazole (les iconographies sont représentées dans le Tableau n°XXX).

On peut conclure que le gel CMF et le Miconazole sont actifs *in vitro* contre le développement du *Candida albicans*.

Tableau n° XXX: Taux de survie du *Candida albicans* ATCC 26790 après 24h d'incubation dans les conditions étudiées (de gauche à droite : témoin, gel base , gel CMF, Miconazole).

	Condition témoin (-)	Excipient/Gel Base (GB)	Gel CMF× 10 et dilué	Miconazole
Souche clinique (10 ⁻¹)				
Souche de référence (10 ⁻¹)				

b. Résultats de la comparaison de l'action anti-biofilm à *Candida* du gel buccal versus Miconazole

Avant la sonication, à T0 le nombre des levures planctoniques (libres) retrouvé dans le milieu de la pastille témoin était semblable à celui retrouvé dans le milieu traité par le gel base GB ($p=0,88$). La même constatation a été faite pour les levures planctoniques retrouvées dans la pastille traitée par le gel CMF et celle traitée par le Miconazole ($p=0,07$). Par contre, on note une différence significative entre les levures en suspension dans la condition du gel base et celle du gel CMF ($p=0,01$), cette signification était valable aussi pour le gel base versus Miconazole ($p=0,0001$) (Figure n°84) (cf. Tableau n°XXXI).

Après la sonication, à T5, on note que le nombre des levures totales (planctonique et sessiles) traitées par le gel CMF comparé à celles traitées par le Miconazole était non significatif ($p=0,12$), alors qu'une différence statistiquement significative était relevée pour les levures traitées par gel base vs gel CMF et gel base versus Miconazole. ($p= 0,0001$)

Il y a bien eu une formation d'un biofilm à *Candida albicans*, qui était rapporté par un nombre significatif des cellules adhérentes à la pastille témoin entre T0 et T5.

Le nombre des levures adhérentes sur la pastille traitée par le gel base GB entre T0 et T5 était à l'approche de la signification ($p= 0,07$).

Aucune signification n'est rapportée pour les cellules adhérentes pour les pastilles traitées par le gel CMF et Miconazole entre T0 et T5 ($p= 0,2$).

Conclusion : Le Miconazole et le gel CMF assure une action anti- biofilm et sont donc efficace contre un biofilm à *Candida albicans* déjà formé (Figure n°85 A).

Un pourcentage moyen de 80% de l'adhésion des cellules fongiques est rapporté pour la pastille traitée par l'excipient (GB) , contre un pourcentage moyen ne dépassant pas 1% des cellules adhérentes à la pastilles traitée par le gel CMF ($p= 0,0001$) et ne dépassant pas 3% pour la pastilles traitée par le Miconazole ($p= 0,0001$).

En même temps, on note une différence de pourcentage de l'adhésion fongique aux pastilles traitées par le gel CMF et le Miconazole à l'approche de la signification ($p=0,07$) (Figure n°85B).

- On conclue que les cellules du *Candida* ont adhérentes à la pastille traitée par le gel base et pas aux pastilles traitées par le gel CMF et le Miconazole.
- On peut en termes de comparaison entre les gels CMF et Miconazole, que leur efficacité anti biofilm est semblable. Cela signifie que le Miconazole et le gel CMF possède la même efficacité anti fongique.

L'évaluation mycologique a été effectuée en comptant le nombre de colonies de levures.

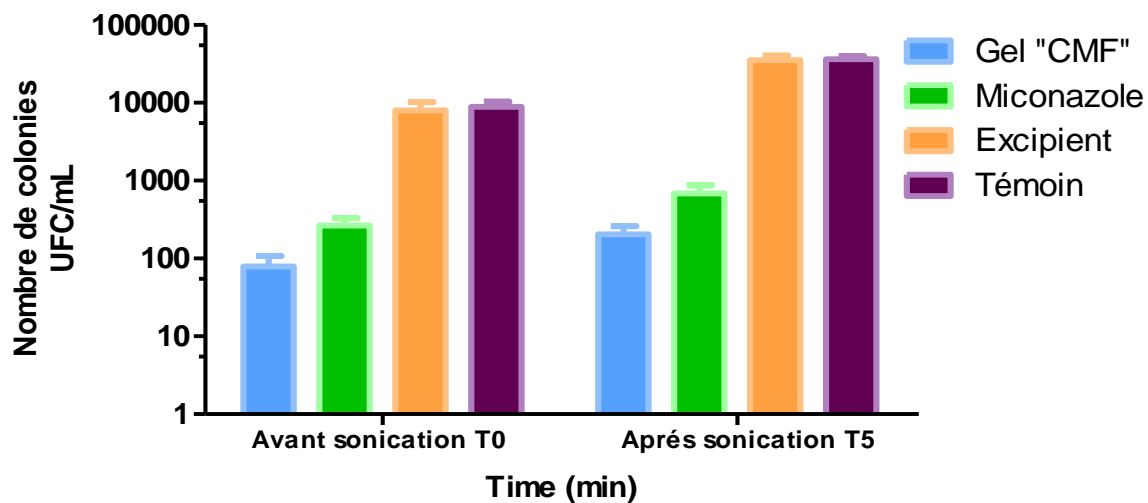
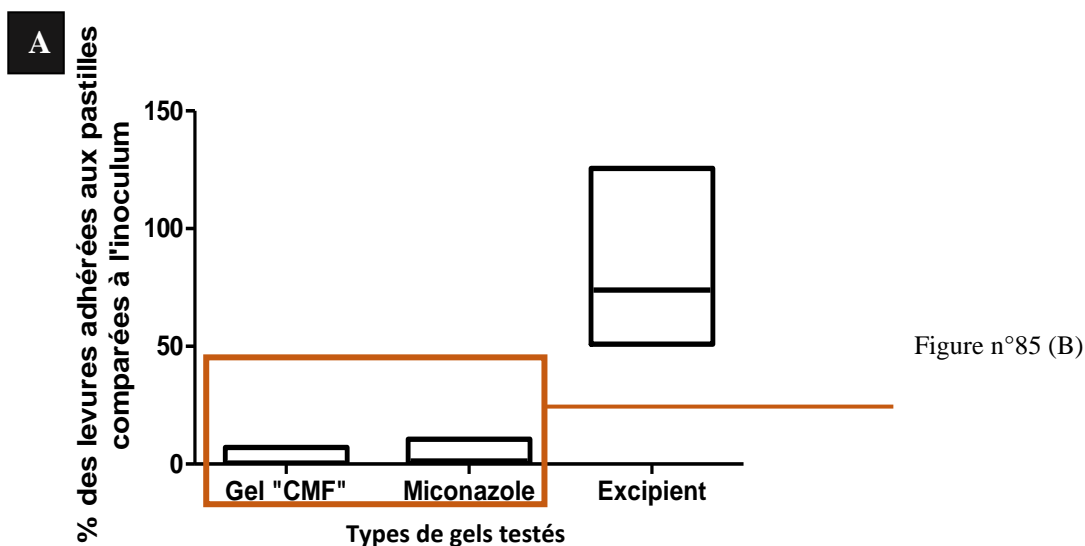


Figure n°84 : Comparaison du nombre des levures (UFC/mL) planctoniques (libres) avec celui des levures totales (libres + adhérees) dans les différents milieux des pastilles acryliques traitées et non traitées. Moyenne et écart type. Signification $p < 0,05$. $n= 7$

Tableau n°XXXI : Comparaison du p value du résultat du nombre de levures planctonique et totales.

Comparaison	p value	Signification
Gel CMF T0 versus Miconazole T0	0,0844	Non significatif
Gel CMF T0 versus Excipient T0	< 0,0001	Très significatif
Gel CMF T0 versus Témoin T0	< 0,0001	Très significatif
Miconazole T0 versus Excipient T0	< 0,0001	Très significatif
Miconazole T0 versus Témoin T0	< 0,0001	Très significatif
Excipient T0 versus Témoin T0	0,8822	Non significatif
Gel CMF T5 versus Miconazole T5	0,1261	Non significatif
Gel CMF T5 versus Excipient T5	< 0,0001	Très significatif
Gel CMF T5 versus Témoin T5	< 0,0001	Très significatif
Miconazole T5 versus Excipient T5	< 0,0001	Très significatif
Miconazole T5 versus Témoin T5	< 0,0001	Très significatif
Excipient T5 versus Témoin T5	0,9157	Non significatif
Gel CMF T0 versus Gel CMF T5	0,2128	Non significatif
Miconazole T0 versus Miconazole T5	0,2230	Non significatif
Excipient T0 versus Excipient T5	0,0783	Non significatif
Témoin T0 versus Témoin T5	0,0008	Très significatif



Comparaison	<i>p</i> value	Signification
Gel CMF versus Miconazole	0,0795	A l'approche de la signification
Gel CMF versus Excipient	< 0,0001	Non significatif
Miconazole versus Excipient	< 0,0001	Non significatif

Figure n°85 (A) : Comparaison du pourcentage des levures ayant adhérees aux pastilles en résine traitées par gel « CMF » et par gel Miconazole. Médiane et valeurs extrêmes. Signification $p < 0,05$. $n = 7$.

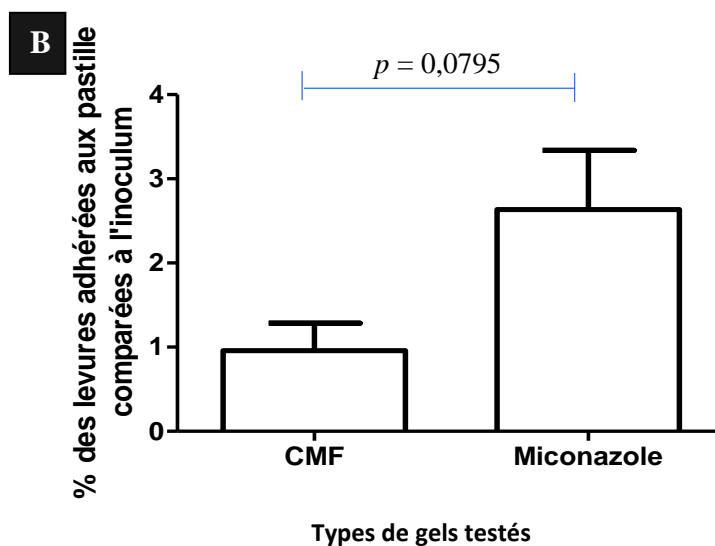


Figure n° 85 (B): Comparaison du pourcentage des levures adhérees aux pastilles en résine traitées par gel « CMF » et par gel Miconazole. Moyenne et écart type. Signification $< 0,05$. $n = 7$.

3.2.2.3. Résultats de l'étude de la cytotoxicité

a. Résultats de l'appréciation qualitative de la cytotoxicité

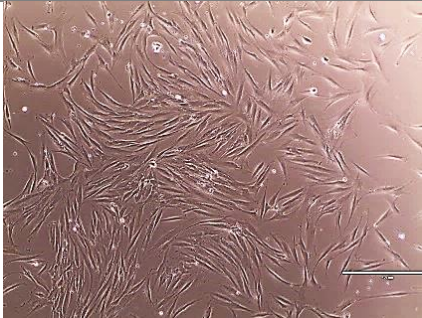
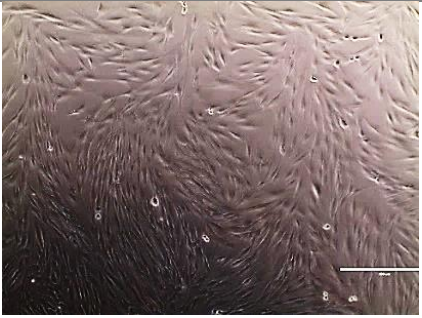
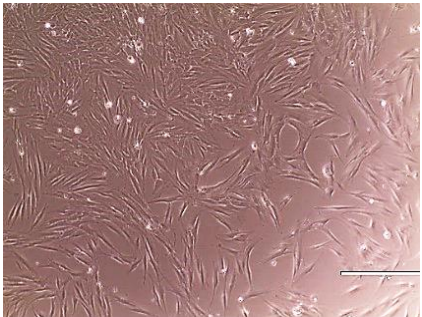
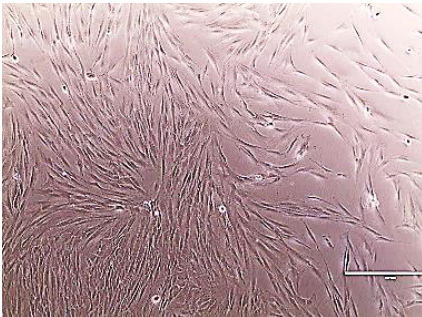
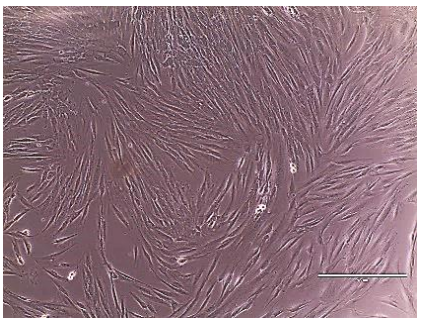

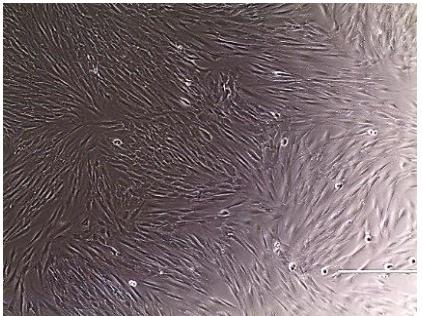
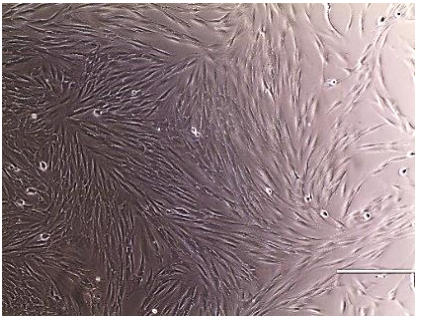
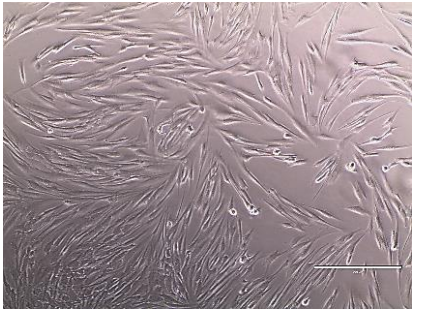
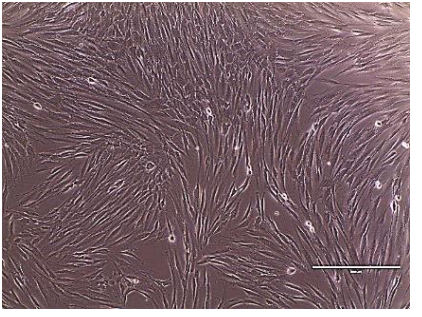
La comparaison de l'observation des FGH au microscope à écran avant et après traitement par les différents gels, mettait en évidence :

- Une intégrité de la membrane cytoplasmique des cellules.
- Une cohésion inter cellulaire (présence de nombreux contacts entre cellules)
- Une disposition architecturale homogène.
- Une adhérence des cellules au polystyrène : grâce à leur forme allongée,
- Pas de cellules décollées, libres, rondes, flottantes.
- L'état de confluence : est de l'ordre de 80 % à 90%, une confluence aboutissant à un tapis cellulaire.

L'aspect morphologique des FGH traitées par les différents gels était semblable à celui des FGH témoins avec absence de signes révélateurs d'une toxicité des produits gels sur les capacités d'adhésion des FGH et sans effet de modification sur la confluence (densité).

On conclue que les FGH placés au contact des différents gels sont viables et qu'ils n'ont subi aucune modification morphologique comparés aux FGH témoins (Tableau n°XXXII).

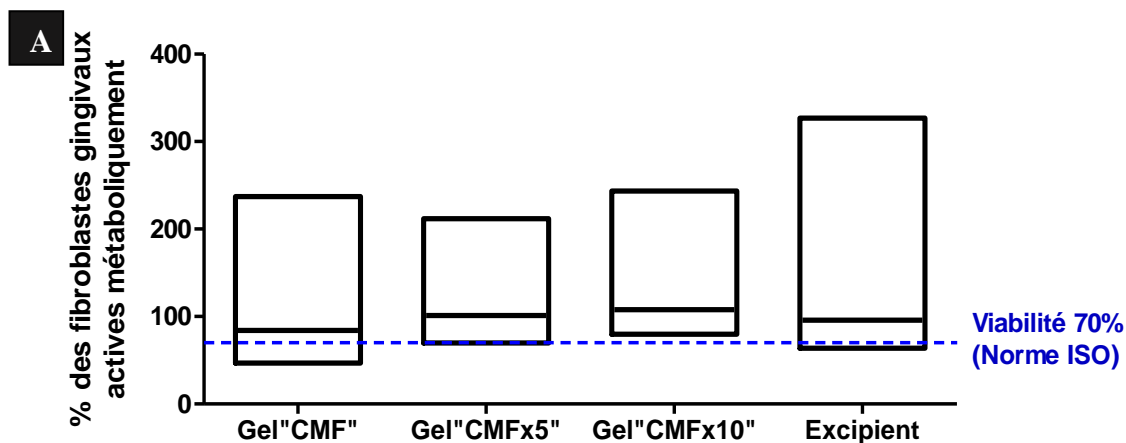
Tableau n° XXXII: Etude de la viabilité des cellules fibroblastes gingivaux humains (FGH) de la muqueuse orale traitées et non traitées par les différents gels. Microscopie optique. Grossissement $\times 10$ (échelle 400 μm). Iconographie personnelle. Laboratoire BIOS, Université de Reims.

Conditions	Avant traitement	Après traitement de 24h
FGH Témoins		
Gel base		
Gel CMF (x1)		
Gel CMF x5		
Gel CMF x10		

b. Résultats de l'appréciation quantitative de la cytotoxicité

□ Résultats de l'étude de la viabilité cellulaire

Le pourcentage des FGH actives métaboliquement traitées par les différents produits affiche un taux de survivance au-dessus de 70% (norme ISO), témoignant que ces gels maintiennent les cellules viables quel que soit la concentration testée. (Fig n°86)



Comparaison	p value	Signification
Gel CMF versus Gel CMF ×5	< 0,0001	Très significatif
Gel CMF versus Gel CMF ×10	< 0,0001	
Gel CMF versus Excipient	< 0,0001	
Gel CMF ×5 versus Gel CMF ×10	0,0006	
Gel CMF ×5 versus Excipient	0,0004	
Gel CMF ×10 versus Excipient	< 0,0001	

Figure n°86 (A) : Résultats de l'activité métabolique de la culture des fibroblastes gingivaux humains FGH, en précisant la médiane et les valeurs extrêmes pour chaque type de gel. Intervalle de confiance 95% Signification $p < 0,05$. n = 6.

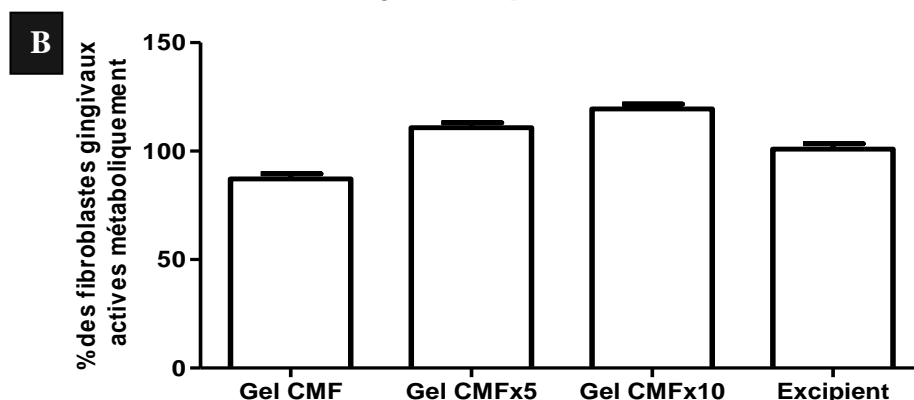


Figure n°86(B) : Résultats de l'activité métabolique de la culture des fibroblastes gingivaux humains FGH, en précisant la moyenne et l'écart type pour chaque gel testé. Intervalle de confiance 95%. Signification $p < 0,05$. n = 6.

❑ Résultats de la quantification de l'ADN cellulaire

La quantité d'ADN des FGH traitées par les différents gels était suffisamment élevée, elle est de l'ordre de 96% pour le gel CMF, 94,1% pour le Gel CMF ×5, 91,4 % pour le gel CMF ×10, et de 85,5% pour le gel base (excipient) (Fig n° 87)

Nous concluons que la forte teneur en ADN des cellules FGH est en corrélation avec les résultats obtenues avec le test de viabilité WST-1, et donc les cellules sont viables et métaboliquement actives en présence des différents gels.

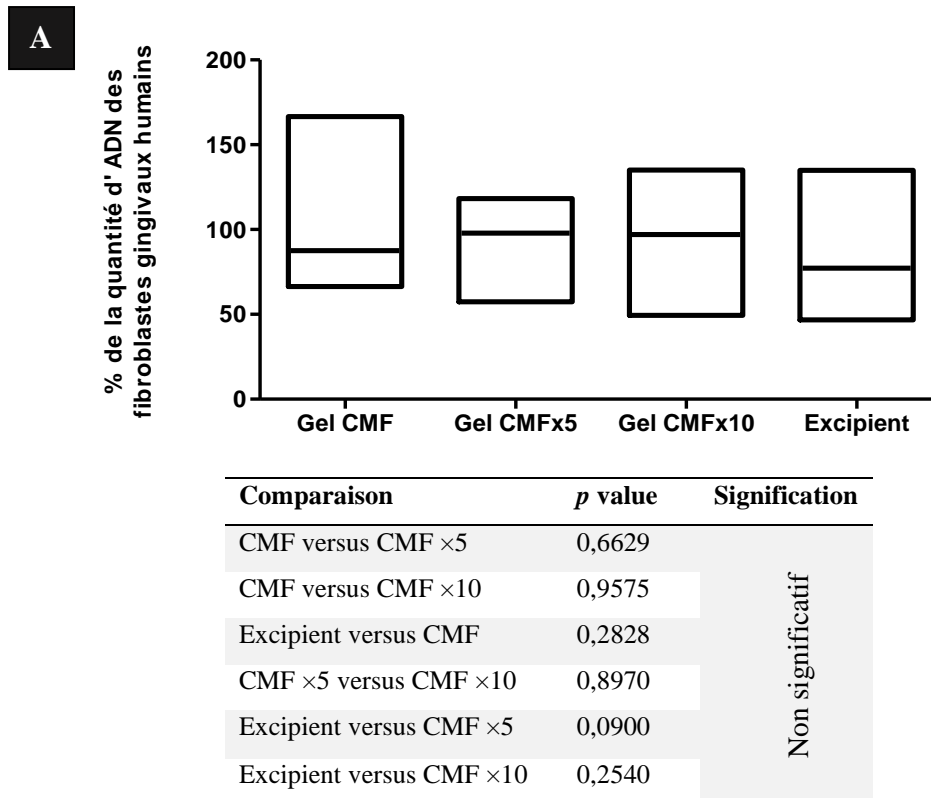


Figure n°87 (A) : Résultats de la quantification d'ADN dans les cultures des fibroblastes gingivaux humains en présence des différents types de gels, normalisée à la condition de contrôle, en affichant la médiane et les valeurs extrêmes, Signification $p < 0,05$. Intervalle de confiance 95%. n=6

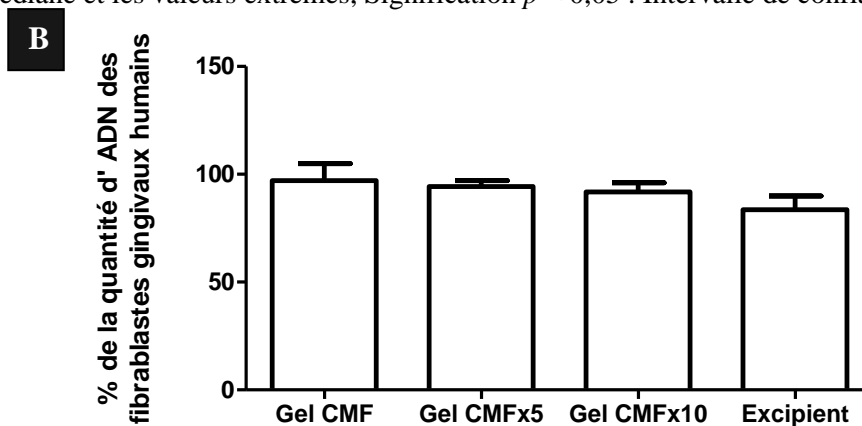


Figure n°87 (B) : Résultats de la quantification d'ADN dans les cultures des fibroblastes gingivaux humains en présence des différents types de gels, normalisé à la condition de contrôle, en précisant la moyenne ainsi que l'écart type, Signification $p < 0,05$. Intervalle de confiance 95%. n=6

❑ Résultats de l'étude de la mortalité cellulaire

Le taux de la LDH dans le surnageant de la culture des FGH traités et non traités exprimé par l'absorbance, ne montre aucune différence significative avec le témoin (TCPS).

Ces résultats révèlent, au cours de 24h, une absence d'une activité LDH au sein de toutes nos conditions (Fig n°88).

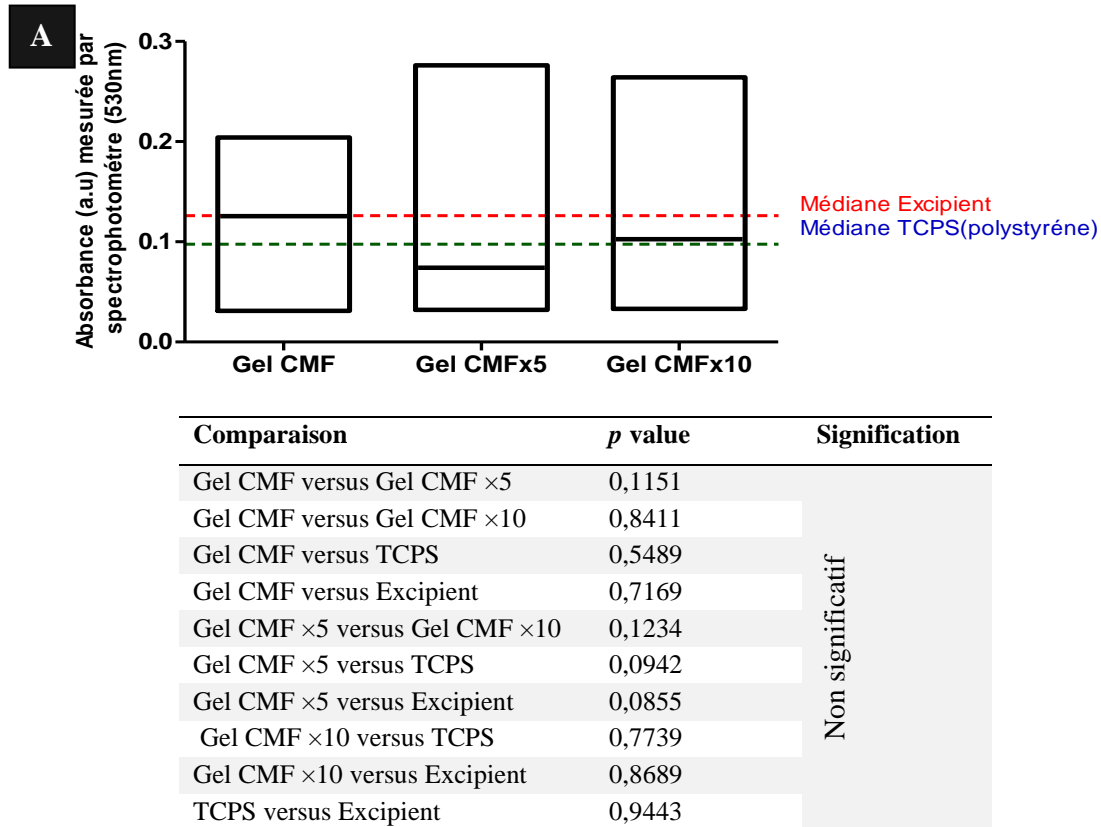


Figure n°88 (A) : Etude de la toxicité des différents gels étudiés sur les cellules fibroblastes gingivales humaines. Résultats l'activité lactate déshydrogénase (LDH) dans les surnageants de culture des FGH en présence des différentes conditions, médiane et valeurs extrêmes. Signification $p < 0,05$. Intervalle de confiance 95%, $n=6$.

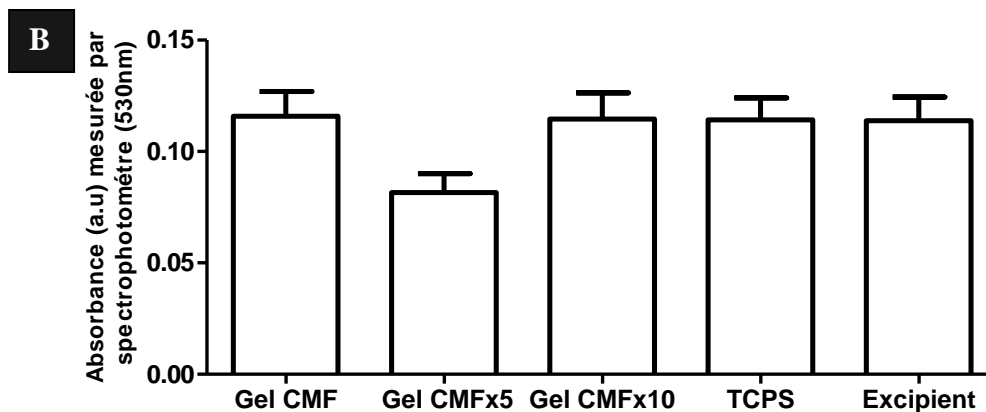


Figure n°88 (B) : Etude de la toxicité des différents gels étudiés sur les cellules fibroblastes gingivales humaines. Résultats l'activité lactate déshydrogénase (LDH) dans les surnageants de culture des FGH en présence des différentes conditions, médiane et valeurs extrêmes. Signification $p < 0,05$. Intervalle de confiance 95%, $n=6$. TCPS : polystyrène des microplaques (condition de témoin)

3.2.2.4. Résultats de l'étude histologique des greffons palatins placés au contact du produit

La coupe histologique du greffon palatin coloré par la méthode HES indique (Figure n° 89) :

- un épithélium intègre avec une couche de fine de kératine, un corps malpighien sub normal avec des noyaux réguliers (violet foncé), la membrane basale est disposée d'une manière homogène, le cytoplasme est en rose.
- un chorion homogène fibro-adipeux très riche en collagène (orange)

On note l'absence d'une souffrance cellulaire, de signes révélateurs de déformations, de fragmentations cellulaires, ou d'inflammation (absence des lymphocytes) et pas de nécrose ou de lyse cellulaire, par conclusion les produits Gel CMF et Excipient n'ont aucun retentissement sur l'aspect histologique de l'épithélium et du conjonctif.

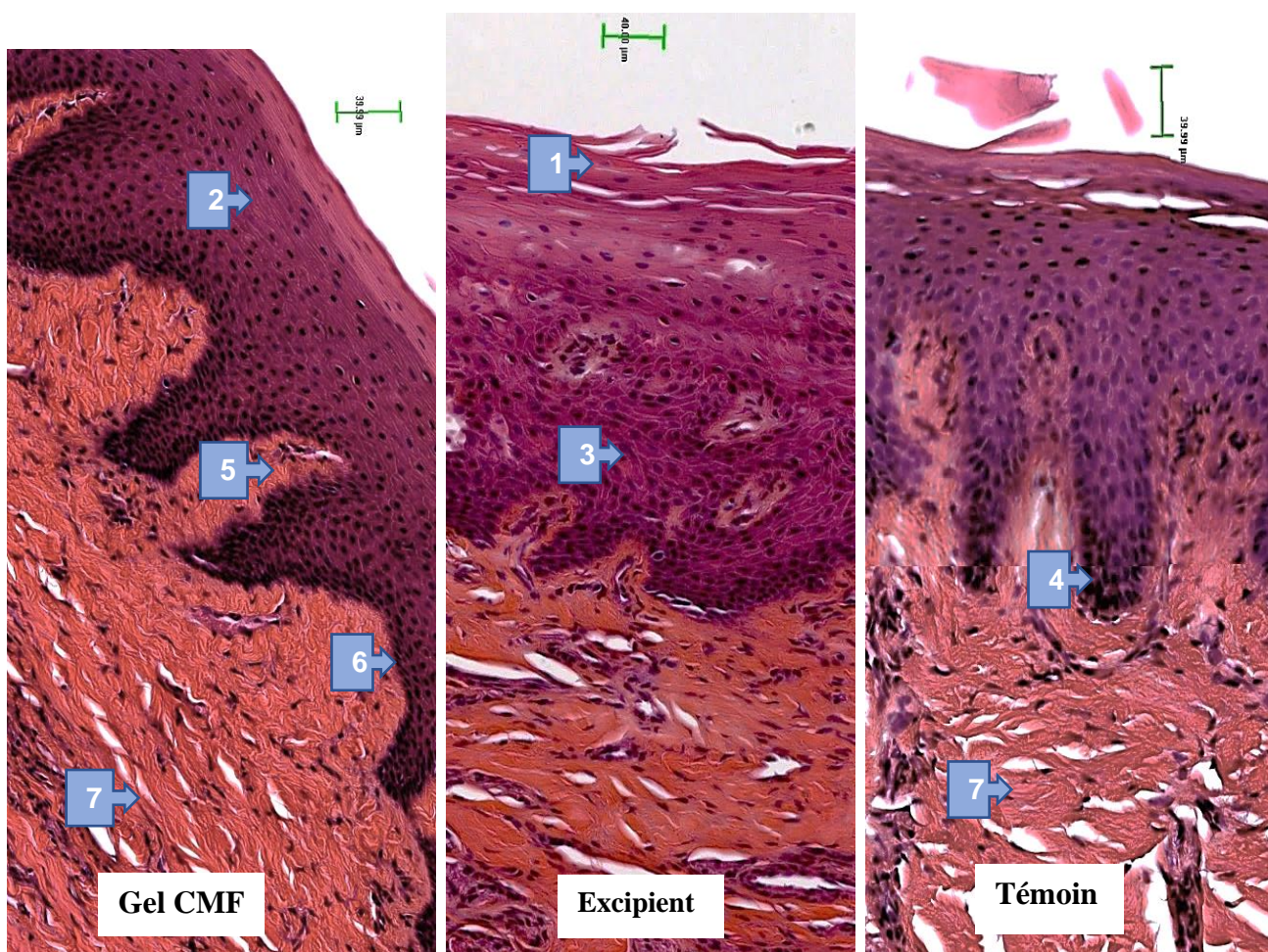


Figure n° 89 : Coupe histologique de la muqueuse palatine traitée par Gel CMF et Excipient ,et non traitée (Témoin), après 24h de culture, et colorée par HES (grossissement $\times 20$), 1: Fine kératose, 2:couche granuleuse, 3: corps muqueux de Malpighi, 4:Crête épithéliale, 5:Papille conjonctive, 6 :Membrane basale, 7:Chorion. (La barre d'échelle indique 40µm) Iconographie personnelle. Laboratoire BIOS.

3.2.2.5. Résultats de l'étude immunohistochimique des greffons palatins placés au contact du produit

La coloration Caspase 3 clivée corrobore avec ce qui a été énoncé précédemment : l'épithélium comprend plusieurs couches cellulaires ce qui renseigne sur une protection efficace, les cellules conjonctives se présentent sous leur état normal, la distribution cellulaire est homogène, le noyau est coloré en bleu foncé et le cytoplasme en bleu clair (Figure n°90).

On note la présence de quelques cellules apoptotiques où la cellule est colorée en violet (flèche jaune) qui représentent des cellules programmées physiologiquement pour mourir en silence, afin de maintenir un équilibre cellulaire dans les tissus (suicide cellulaire). On conclue encore une fois que les produits Gel CMF et Excipient n'engendrent aucune perturbation histologique et par conséquent ils ne sont pas cytotoxiques.

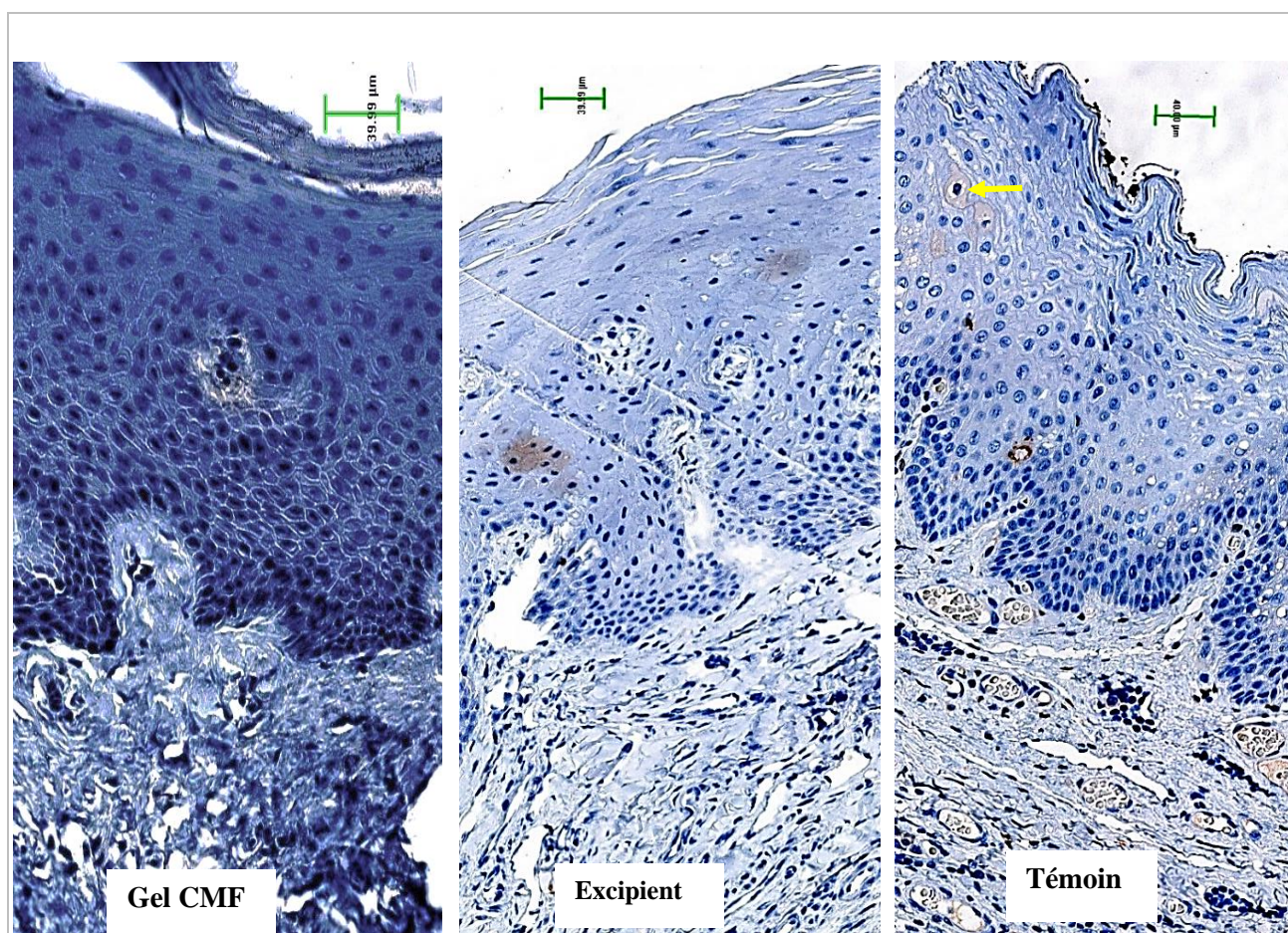


Figure n° 90 : Coupe histologique d'une coloration immunohistochimique par clivage de la caspase 3 clivée (grossissement $\times 20$) montre peu de cellules apoptotiques (flèche jaune) en condition de Gel CMF, d'Excipient et de Témoin. (La barre d'échelle indique $40\mu\text{m}$)

Iconographie personnelle. Laboratoire BIOS.

CHAPITRE 4 :

Discussion

Discussion

Le développement de la stomatite prothétique après l'insertion des prothèses, sa récurrence après traitement et la résistance des levures aux antifongiques, sont des éléments qui ont inspiré notre étude, annexée à la valorisation des plantes aromatiques, plus précisément la plante endémique à l'Algérie « Thym », afin de pouvoir développer un produit de phytothérapie efficace.

Nous pensons que notre étude a pu se rapprocher de ses principaux objectifs fixés au départ, qui étaient de comparer l'activité antifongique des huiles essentielles de thym et de girofle avec celle du Miconazole dans le traitement des stomatites prothétiques et d'étudier leur cytotoxicité, ainsi que l'estimation de la prévalence et de la sévérité de ces lésions chez l'édenté total appareillé à Tlemcen, afin de les comparer aisément avec les données épidémiologiques des autres pays.

4.1. Discussion sur l'Etude Epidémiologique

Notre étude épidémiologique visait à déterminer la prévalence et les facteurs de risque de la stomatite prothétique à Tlemcen, grâce à des données cliniques permettant de poser le diagnostic de la stomatite et d'évaluer sa sévérité, et à l'utilisation d'un questionnaire simple et valide qui comptait cinq questions concernant les habitudes de l'hygiène bucco-prothétique, et d'autres portant sur les antécédents prothétiques (type et ancienneté de la prothèse dentaire).

La population cible était composée de patients sélectionnés à partir de la consultation générale, le recrutement a eu lieu selon des critères diagnostiques conformément aux études précédentes. Cette étude sur la stomatite prothétique a rapporté une prévalence de 32 %, l'échantillon des patients comprenait 78 individus, dont 25 hommes et 53 femmes « sexratio 0,47 » et avec un âge moyen plutôt jeune de 58 ± 41 ans, puisque la majorité de nos patients privilégient les extractions dentaires au détriment des soins conservateurs, et seulement quatre d'entre eux consultaient pour des douleurs due à la lésion.

Le questionnaire présentait un avantage certain par sa simplicité. Les informations relatives aux méthodes d'hygiène bucco-prothétiques étaient présentées aux personnes âgées et les questions étaient demandées progressivement dans un ordre chronologique bien précis facilitant les réponses aux patients. Cependant, il convient d'insister sur le fait que ce questionnaire présente des limites, qui sont communes à tous les questionnaires, comme la difficulté de compréhension de certains termes par les sujets âgés parfois illettrés, qui avaient nécessité une explication au préalable.

Parmi les objectifs de notre travail, l'identification du type de levures impliquées dans la SP : l'intrados prothétique était écouvillonné sur trois zones palatines différentes par un tour complet de l'écouvillon sur lui-même (zone antérieure, moyenne et postérieure). Le prélèvement était réalisé sur une prothèse maxillaire dès sa désinsertion de la bouche.

A l'issue de l'identification mycologique, l'ensemble des patients ont reçu un traitement antifongique locale « le Miconazole ».

4.1.1. Discussion des données socio démographiques : sexe, âge.

Nos résultats s'accordent avec un grand nombre d'études concernant le sexe (sexratio 0,47) ; en effet les femmes paraissent être les plus touchées par la SP [9, 86, 92, 93, 95, 103, 131, 132, 172, 180, 201, 226], en raison des perturbations hormonales, et soucieuses de leur état buccal et de leur esthétique, elles privilégient le port continu et consultent plus souvent que les hommes,. Tandis que d'autres enquêtes ne montrent aucune différence de prévalence entre les sexes [11, 12, 20, 41, 152, 161, 228].

L'âge des patients s'étendait de 40 à 76 ans avec un âge moyen de 58,41 ans \pm 9,2, la tranche d'âge de [50 -60[était la plus touchée par la SP, on peut prétendre que l'âge est en faveur d'une installation de la SP, ce qui rejoint l'avis de plusieurs auteurs [71, 82, 103, 131, 204]. A l'inverse, d'autres ne remarquent aucune relation entre l'âge et la SP [12, 20, 161, 202].

Il est vrai qu'avec l'âge, la réduction de l'autonomie et de la dextérité manuelle conduisent à une hygiène bucco-prothétique de plus en plus difficile, qui est souvent méconnue par les patients, en outre, le sujet âgé étant immunodéprimé (perméabilité de la muqueuse orale), la formation de la plaque prothétique est inéluctable, engendrant le développement et le maintien de la stomatite prothétique.

Les praticiens devraient porter une attention particulière à l'AGE lorsqu'ils prennent en charge des patients nécessitant des prothèses dentaires complètes à confectionner.

4.1.2. Discussion sur le motif de consultation

Les patients qui ont consulté notre service se plaignaient de l'état de leurs prothèses maxillaires soit parce qu'elles étaient anciennes (39,7%) soit parce qu'elles étaient non fonctionnelles (instabilité (28,2%) et fracture (27 %)). Rare étaient les patients qui ont rapportaient une douleur au palais (5,1%). **Barbeau** *et al.* [20] constataient que les motifs de consultation de leurs patients étaient : inconfort (45%), ancienneté de la prothèse dentaire (26%), instabilité (13%), et fractures (9%). **Navabi** *et al* [161] avaient suggéré que l'instabilité figurait parmi les facteurs locaux favorisant le développement des stomatites prothétiques, puisqu'ils rapportaient que plus du tiers de leurs patients se plaignaient de prothèses mal ajustées.

Peu de patients dénonçaient une sensation de brûlure, de saignements des muqueuses, de mauvaise odeur ou d'altération des sensations gustatives[103, 155].

La découverte de la stomatite prothétique pour l'ensemble de notre population était fortuite lors d'un examen clinique routinier, sans que le patient n'ait conscience de l'état de sa muqueuse palatine.

C'est exactement ce qu'avait remarqué la majorité des auteurs, que la stomatite prothétique est une lésion chronique non douloureuse [76, 95, 205]. Par conséquent, la stomatite prothétique risque d'évoluer en silence et engendrer des pathologie plus sévères telles qu'une mycose du tractus gastro intestinale par propagation de l'infection vers la gorge et l'estomac, ou une fongémie (infection systémique par propagation fongique dans le flux sanguin) chez les sujets diabétique ou immunodéprimés [168], ce qui fait d'elle une lésion dangereuse.

4.1.3. Discussion sur la pathologie de la stomatite prothétique

4.1.3.1. Discussion de la prévalence de la stomatite prothétique et de son type et grade

La Stomatite prothétique est l'une des lésions les plus courantes chez les patients édentés appareillés [119] ,sa prévalence diffère selon les études et cette variabilité est probablement due à plusieurs facteurs : l'âge, le sexe, des facteurs locaux comme les mesures d'hygiène, le port continu, et l'état de santé de la population concernée. Plus fréquente chez les porteurs de prothèses complètes [41, 171] avec une prévalence de 88,4% contre 11,6% chez les porteurs de prothèses partielles [161].

Enormément de chercheurs , dans le monde, se sont intéressés à la prévalence de la stomatite prothétique durant ces dernières décennies, en revanche ,peu d'études rapportent cette prévalence dans notre pays [25, 171].

La plupart des auteurs n'ont pas précisé l'existence ou pas d'une affection d'ordre générale ainsi que de leurs patients (cardiopathie, hypertension, diabète, pathologies psychiatriques) ; Rappelons-le, dans notre étude, nous avons inclus uniquement des patients sains sur le plan général ; Par ailleurs, la subjectivité de la classification de Newton peut aussi expliquer, en partie, la variabilité entre les différentes enquêtes, malgré cela nous tenterons de discuter et de comparer nos résultats.

La prévalence de la stomatite prothétique varie de 10 à 75% des porteurs de prothèses [78, 119, 139]. Selon d'autres auteurs, au moins un tiers de la population appareillée est touchée par cette lésion[76]. Le résultat de la présente étude a montré une prévalence de 32,8%, considérée comme une prévalence moyenne comparativement aux résultats des autres pays [93, 114, 135, 172, 205, 219]. Une prévalence avoisinante était rapportée par **Benaissa** et *al.* à Sidi Belabbes en 2016 [25] 37,1%, en revanche celle retrouvée par **Oussadit** à Tlemcen en 2009 [171] était légèrement plus importante 46,2% (Tableau n°XXIX).

Dans la présente étude, la stomatite de type II de Newton était la plus fréquente, suivi du type I et du type III, probablement à cause d'une diffusion plus ou moins rapide de la forme localisée vers la forme

généralisée ; sur les 78 patients, nous avons trouvé 25 patients de type I (32,1%), 43 avec type II (55,1%) et 10 avec type III (12,8%). Ce résultat est compatible avec une étude similaire réalisée par **Pereira et al** [175], où les lésions de type II étaient également les plus fréquentes. Seuls **Webb et al** [219], **Oussadit** [171] et **Naik et al** [159], ont montré une prévalence de type II supérieure à la nôtre (66% à 84%). D'autres études menées par **Figueiral et al.** [86], **Pires et al.** [180], **Navabi et al.** [161] Et **Kossioni et al.** [120] ont constaté que l'inflammation localisée de type I était plus susceptible d'être rencontrée en situation clinique que les autres types, elle représenterait un fait normal puisque c'est une stomatite traumatique, survenue généralement durant les premiers jours de la mise en bouche prothétique (jusqu'à 07 jours) [152, 159]. La prévalence du type III retrouvée dans notre étude est conforme aux rapports précédents [57, 120, 122, 205].

La taille de l'échantillon de notre population était acceptable comparativement à celle des études menées à travers le monde, parfois plus élevée [161, 180] (cf Tableau n° XXXIII).

Tableau n° XXXIII: Prévalence de la stomatite prothétique chez l'édenté total porteur de prothèses amovibles (%).

Auteurs et Références Bibliographiques	Pays	Cas SP/ Échantillon	Age (Années)	Prevalence (%)	Type de SP %		
					Type I	Type II	Type III
1. Budtz-Jorgensen et al. 2000 [37]	Genève	§/147	85,6 ± 6,9	45% @	50,3	29	20,6
2. Pires et al. 2002 [180]	Brésil	39/77	61,7	50,6%	53,8	36	10,2
3. Kulak-Ozkan et al 2002 [122]	Turquie	31/70	-	44,3%	51,6	38,7	9,6
4. Epinoza et al.2003[80]	Chili	198/889	>65	22,3%	-	-	-
5. Barbeau et al. 2003 [20]	Canada	48/68	60 ± 11,3	70,6%	12,5	35,4	52,1
6. Shulman et al. 2004 [205]	Etats Unis	389/1519	59,2	25,6%	56,25		43,75
7. Coello et al.2004[58]	Brésil	111/192	-	58,3%	-	-	-
8. Webb et al. 2005 [219]	Australie	60/ 160	-	37,3%	8,3	83,3	8,3
9. Emami 2005 [75]	Canada	31/40	64	77,5%	48,3	45,1	6,5
10. Marchini et al. 2006 [139]	Brésil	§/153	74,9±12,9	19,5 % @	-	-	-
11. Figueiral et al. 2007 [86]	Portugal	58/128	59,75	45,3% @	41,4	34,3	24,3
12. Mathew et al 2008 [146]	Inde	10/45	41 à 60	0,8%	-	-	-
13. Coco et al. 2008 [57]	Angleterre	26/37	-	72%	46	34,6	19,2
14. Bilhan et al. 2009 [27]	Turquie	71/108	62,2 ± 9,4	65,7%	42,2	38	19,7
15. Oussadit 2009[171]	Algérie Tlemcen	74/160	60,5±12,5	46,2%	66,2	25	9,2
16. Merdes 2009 [152]	Algérie Annaba	18/30	58,1	60%	94,4	5,5	-
17. Rabiei et al. 2010 [184]	Iran	26/57	> 65	45,6%	-	-	-
18. Jainkittiyong et al. 2010[112]	Thaïlande	§/186	-	18,1% @	-	-	-
19. Evren et al. 2011 [81]	Turquie	59/139	76,2 ± 8	42,4%	-	32,2	67,8
20. Kossioni et al. 2011 [120]	Grèce	42/106	67,7 ± 9,9	39,6%	43	40,4	16,6
21. Savignac et al. 2011 [198]	Canada	119/135	71 ± 4,5	88,7%	49,6	34	16,4
22. Naik 2011 [159]	Inde	70/100	-	70%	7	84	9
23. Zomorodian et al 2011 [227]	Iran	53/114	70,4	46,5 %	-	-	-
24. Mandali 2011[135]	Turquie	54/153	61,8 ± 9,8	35,3%	-	-	-
25. Navabi et al. 2013 [161]	Iran	43/70	58,2±12,3	88,4@	62,8	32,5	4,6
26. Martori et al 2014 [144]	Espagne	12/84	60	14,3@	50	50	00
27. Kabawat et al. 2014[114]	Canada	48/135	66 ± 11,2	35,5%	25	43,8	31,2
28. Figueiral et al. 2015 [87]	Portugal	21/ §	57,6 ± 3,1	-	22,2	44,4	33,3
29. Patil 2015 @[172]	Inde	1734/5100	69 ± 6,3	34%	-	-	-
30. Gaur 2015 [93]	Inde	224/608	-	36,8%	-	-	-
31. Benaïssa et al. 2016 [25]	Algérie Sidi Belabbes	§/105	57,1± 1,2	37,1% @	-	-	-
32. Pereira et al.2016 [175]	Brésil	50/100	63 ± 9	50% @	42	48	10
33. Čanković et al. 2017 [41]	Serbie	34/99	65,1 ± 5,1	34,3%	48	24	28
34. Khare et al. 2017 [119]	Inde	13/21	-	62%	46,1	15,3	38,4
35. Fayad et al. 2018 [82]	Arabie Saoudite	60/256	54,2	23,4%	-	-	-
36. Gauch et al.2018 [92]	Brésil	36/ §	62	-	50	33	17
37. Al-Sanabani 2018[7]	Yemen	288/§	56.5	-	66,7	33,3	00
38. Notre étude 2019	Algérie Tlemcen	78/ 238	58,4 ±9,2	32,8%	32,1	55,1	12,8

@ : Type d'édentement total ou partiel non précisé (nature de prothèse amovible)

§ : Nombre d'échantillon des patients non défini.

- : condition non définie.

4.1.3.2. Discussion sur les caractéristiques cliniques de la stomatite prothétique

Le diagnostic de la stomatite prothétique est établi à partir des critères cliniques de la lésion, notamment un érythème de la muqueuse recouverte par la prothèse supérieure, comme c'est le cas pour la majorité de nos patients (74,4%) celui-ci peut être associé ou non à un œdème et/ou à des saignements, parfois à des douleurs de type brûlures. Elle serait appariée à une chéilite angulaire dans 33 à 82% des cas [117]. Selon **Kabawat** et al 2014 [114] les symptômes comme une halitose, une sécheresse buccale, une altération des sensations gustatives seraient aussi fréquents[103].

4.1.4. Discussion des facteurs de risques locaux

Notre étude a évalué différents facteurs incriminés dans l'installation de la stomatite prothétique tels que l'ancienneté des prothèses, l'hygiène bucco-prothétique, le port prothétique nocturne, la conservation des prothèses, et le tabagisme, indiquant qu'il n'y avait guère de certitude statistique permettant de conclure quant à leur causalité.

Effectivement, étant donné que notre échantillon était composé uniquement de patients atteints (avec stomatites prothétiques) et que notre étude était descriptive et non pas analytique, les facteurs de risque étudiés seront décrits et discutés, sans pour autant pouvoir certifier significativement leur rôle déterminant dans l'apparition de la stomatite prothétique.

Malgré la forte prévalence, l'étiologie de la maladie n'est pas complètement comprise, elle semblerait être multifactorielle, avec une prédominance des facteurs locaux.

4.1.4.1. Ancienneté des prothèses amovibles

L'ancienneté des prothèses a été corrélée à la stomatite prothétique dans plusieurs études récentes menées par **Figuerial** et al [86], **Kossioni** et al [120] **Bilhan** et al [27] et **Khare** et al [119] (Tableau n°30). Même si notre résultat est sans déduction significative, la majorité de nos patients 90% possédaient leurs prothèses depuis 10 ans et plus. Une étude réalisée par **Pires** et al [180] était très importante à cet égard, car les différentes incidences de la stomatite prothétique étaient évaluées à deux intervalles, avant et après (6 mois d'écart) l'insertion de nouvelles prothèses adéquates. Ce qui a entraîné une diminution de l'incidence de la stomatite prothétique de 50,6% à 18,2% chez la même population. Une explication probable à cette situation serait une dénaturation du matériau de base (abrasion, usure).

En outre, l'ancienneté de la prothèse serait proportionnelle à la colonisation par *Candida* [159]. Une étude de suivi longitudinale sur deux ans réalisée par **Savignac** et al[198] a permis d'observer

l'évolution de la stomatite prothétique dans le temps, sa prévalence était de 64% dès la première année du port prothétique et de 89% à la deuxième année, avec un taux d'incidence de 78,8%.

D'autres études attribuent un rôle secondaire à l'ancienneté de la prothèse dentaire dans le développement de la SP [11, 41]. Malgré cela, il est recommandé de renouveler une prothèse d'usage à partir de cinq années de port prothétique, en raison du vieillissement du matériau de base.

4.1.4.2. Hygiène bucco-prothétique et le brossage du palais

L'évaluation de l'hygiène des prothèses dans la majorité des études [161] était réalisée en posant des questions sur le lavage quotidien des prothèses (semblable à la présente étude) et une évaluation directe sur l'aspect hygiénique des prothèses (présence de plaque ou de tartre à la surface de la prothèse)

Diverses enquêtes étaient réalisées sur les mesures et la fréquence de l'hygiène bucco prothétique; rares sont les articles publiés qui ont pu écarter l'insuffisance de l'entretien des prothèses dentaires des facteurs étiologiques de la stomatite prothétique [198]. Apriori, la majorité de nos patients brossaient leurs prothèses régulièrement 69% à l'eau et au savon/dentifrice 34,2%.

Selon les chercheurs [3, 12, 21, 81, 82, 87, 119, 122, 143], tous les patients diagnostiqués avec une stomatite prothétique présentaient une relation statistiquement inverse avec la fréquence du brossage des prothèses complètes amovibles, l'état des prothèses, et les visites chez le dentiste [81] et une relation proportionnelle avec une dextérité manuelle altérée [139]. Une relation positive était aussi observée entre la croissance des espèces *Candida* et le manque d'entretien des prothèses amovibles [92].

Le brossage du palais était absent, par méconnaissance, chez une grande partie de nos patients 83%. **Savignac et al** [198] quant à eux, ont constaté la nette amélioration des stomatites prothétiques sévères de type II et III par le brossage du palais. **Emami et al** [78] ont aussi observé un résultat inversement proportionnel entre la présence du *C. albicans* et le brossage du palais.

Les surfaces polies sont aussi concernées par une hygiène rigoureuse, une autre étude menée par **Merdes et al.** à Annaba ont mis en évidence les sites préférentiels d'accumulation de la plaque prothétique par coloration des extrados des prothèses amovibles complète, et ont constaté une coloration des zones interdentaires et de toute la zone vestibulaire maxillaire [153] (Tableau n°XXXIV). Force est de constater qu'on accorde beaucoup d'importance à l'hygiène **bucco-dentaire** par le biais de campagnes de sensibilisation, des UDS (Unités de Dépistage et de Suivi), des publicités, et pas assez à l'hygiène **bucco-prothétique** (patients institutionnalisés, maison de retraite) qui assurerait la pérennité des tissus de soutien, d'où la hausse de la prévalence de la stomatite prothétique. Voilà pourquoi, il serait plus judicieux d'attribuer des recommandations préventives concrètes et une

éducation thérapeutique (instructions précises sur les méthodes de nettoyage des prothèses dentaires amovibles) à ce type de pathologie.

C'est clairement, un devoir important de la profession dentaire, à un moment où le nombre de personnes âgées augmente rapidement, de faire en sorte que le public qui porte une prothèse amovible sache comment nettoyer son appareil correctement.

4.1.4.3. Port prothétique nocturne

L'impact dû au port de la prothèse pendant la nuit est un facteur important dans la pathogenèse de la stomatite prothétique [143]. Le port nocturne était retrouvé chez nos patients dans 83% des cas, sans aboutissement significatif. Ce facteur était très associé à la stomatite prothétique dans les études précédentes [12, 20, 27, 82, 119, 120, 205] Il serait un facteur de risque majeur et direct dans l'apparition de la stomatite prothétique [41, 143, 161], puisqu'il augmenterait la durée du traumatisme local, en particulier dans le cas de prothèses mal ajustées [120].

Emami et al[78] a noté une relation directe entre la présence de *C. albicans* et le port prothétique nocturne sachant que les patients qui adoptaient un port prothétique nocturne avaient 26 fois plus de chances de développer une SP par rapport aux patients qui retiraient leurs prothèses la nuit [78].

La valeur du pH de la muqueuse palatine décroît en raison du port prothétique, dû aux produits acides des levures, lactobacilles et streptocoques. En outre, un environnement acide se crée entre la base de la prothèse et la muqueuse buccale qui est causée par une réduction salivation nocturne [93, 143].

4.1.4.4. Type de conservation des prothèses

Pendant que les patients retiraient leurs prothèses la nuit, il fallait trouver un moyen de conservation adéquat pour ces prothèses, qui contribuerai à empêcher la formation du biofilm prothétique. La majorité de nos patients 62,8% gardaient leurs prothèses dans un contenant d'eau. Ceci rejoint les constatations de l'étude de **Navabi** et al [161]. Une autre étude menée à Annaba par **Merdes**[152] a prouvé l'intérêt de la conservation des prothèses au sec, comparée à une conservation humide (avec désinfectant occasionnel), ce qui a permis de réduire l'apparition des stomatites prothétiques à trois fois moins de cas (Tableau n°XXXIV).

Il est vrai que l'immersion des prothèses dans un milieu aqueux permet de stabiliser la résine acrylique (PMMA), susceptible aux variations dimensionnelles des bases, en revanche l'eau favorise l'évolution du biofilm prothétique, raison pour laquelle il est recommandé, s'il y a nécessité, d'y associer un antiseptique [152].

4.1.4.5. Tabagisme

Parmi notre population masculine, 64% sont non-fumeurs, sans certitude statistique et basé sur les résultats de l'étude de **Navabi et al**, [161] il apparaît que la sélection des sujets dans notre étude ne favorisait pas les fumeurs (Tableau n°XXXIV). Ce résultat ne rejoint pas l'avis des autres chercheurs puisqu'ils pensent que la prévalence de la stomatite prothétique est associée au tabagisme, annonçant un taux de 70% des patients qui présentaient une stomatite prothétique de type III étaient de gros fumeurs [5]. Ils en ont conclu que le tabagisme constitue un facteur de risque de la stomatite prothétique [1, 20, 152, 205].

Tableau n° XXXIV : Tableau comparatif des résultats des facteurs de risque rapportés par les différentes études.

	Ancienneté des prothèses (années)	Hygiène prothétique insuffisante (%)	Rinçage des prothèses à l'eau (%)	Brossage prothétique rare (%)	Sans brossage du palais (%)	Port nocturne (%)	Conservation prothétique humide (%)	Fumeurs (%)
Shulmann 2005 [205]	-	-	-	-	-	**	-	*
Bilhan 2008[27]	9,5±8,2 ***	-	-	-	-	85,9**	-	-
Figueiral 2007 [86]	10*	-	-	-	-	63**	-	-
Coco 2008[57]	10,5	61,6	70	-	-	38,5	-	36,6ns
Merdes 2009 [152]	-	-	-	-	-	-	+	30
Kossioni 2010 [120]	16,3 ± 10,9	-	-	40	-	55,7	-	47,1
Evren 2011[81]	-	57,5 ns	42,8***	35,3***	-	68,1***	-	-
Naik 2011 [159]	5 à 10 ns	76,6 ns	-	-	-	-	-	-
Mantori 2014[144]	-	-	-	-	-	42 ns	-	00**
Kabawat 2014[114]	14,6*	80,1***	-	-	-	58,1 ns	-	27,1ns
Al-Sanabani 2018 [7]	83,3 ***	51,8*	-	-	-	-	-	-
Navabi 2018[161]	18,42 *	88,37	7,14	20	-	57,14	25,7	25,71
Notre étude 2019	10 à 20	-	26,9	10,3	83	62	62,8	36

- : condition non définie.

+ : condition présente.

ns :non significatif

* Résultat significatif $p < 0,05$

** Résultat plus significatif $p \leq 0,01$

*** Résultat statistique très significatif $p \leq 0,001$

- ❖ Les résultats épidémiologiques sur la SP, concernant le sexe, l'âge des patients, ainsi que le type et la localisation des prothèses, sont des facteurs impossibles à manipuler, alors que le retrait prothétique nocturne, la motivation à l'hygiène bucco prothétique et le renouvellement des prothèses dans les délais seraient des mesures faciles pour réduire significativement la prévalence de la SP. En effet, actuellement, on peut reprocher aux médecins dentistes l'inexistence d'une sensibilisation des patients à la prévention de la stomatite prothétique, en recommandant entre autre un retrait prothétique nocturne, dès que l'adaptation buccale de celle-ci a été obtenue et un renouvellement des prothèses au bout de cinq ans (quel que soit l'état des prothèses), et aux patients l'absence des visites périodiques qui sont essentielles à la prévention des lésions de la muqueuse par une réadaptation des intrados prothétiques aux surfaces buccales. De ce fait, il est important de concentrer l'approche thérapeutique sur l'information et l'éducation des patients à des fins prophylactiques et curatifs.

4.1.5. Discussion des résultats mycologiques

A l'exemple de plusieurs études, le prélèvement par écouvillonnage de l'intrados prothétique était le plus utilisé par la majorité des chercheurs [9, 27, 54, 57, 75], cependant, un écouvillonnage de la muqueuse palatine [27, 54, 57, 75, 114], un recueil de la solution de rinçage buccale [57, 144, 158], une collection de la plaque prothétique après trempage des prothèses et sonication [57, 75, 78, 144, 198, 202] ou un prélèvement de la salive [9, 27, 41, 86], représentaient les multiples techniques de recherche des microorganismes incriminés dans la formation de la plaque prothétique par la majorité des auteurs.

La mise en évidence des souches de levures était réalisée par une culture en aérobie sur gélose, permettant une identification grâce à un code couleur, suivie d'une identification plus spécifique par système biochimique type Auxacolor™. Comme pour notre étude, le milieu chromogène était employé par plusieurs chercheurs, pour l'isolement et la pré-identification des levures [65, 131, 175, 193, 198, 202, 216, 227], nous avons souhaité confirmer ces résultats par une identification colorimétrique normalisé par auxanogramme [27, 152, 158, 175, 216] étant donné que le milieu chromogène est connu pour ces limites dans l'interprétation de l'espèce *Candida*. D'autres méthodes peuvent être utilisées pour identifier le *Candida albicans*, comme le test de germination[158].

Depuis longtemps l'incrimination microbienne dans la stomatite prothétique était écartée laissant place à une étiologie traumatique [16], pourtant en 1936 **Cahn** [38] avait proposé pour la première fois que l'infection par *Candida albicans* était responsable de la stomatite prothétique.

Par le temps, la présence d'un agent étiologique microbien était approuvée par la majorité des chercheurs, mettant en cause une origine fongique confirmée [122, 158] et une participation bactérienne par le biais d'un biofilm prothétique [1, 9, 41, 86, 117, 119, 152]. En effet, une fréquence élevée des espèces *Candida* était retrouvée chez les porteurs de prothèses dentaires atteints de stomatite prothétique [11, 92].

En considérant l'étude de **Loster** et al [131], le seuil d'infection requis dans notre étude par les levures *Candida* était de 10 colonies dans une boîte de Petri, équivaut à un score d'au moins 100 UFC /mL, celui de **Mantori** et al [144] était d'au moins 20 UFC /mL, alors que **Sivaramakrishnan** [207] rapporte un dénombrement de plus de 400 UFC /mL chez les patients atteints de candidoses chroniques. **Costa** et al [65] quant à lui considère une numération de colonies supérieure à 1000 UFC/mL comme étant un marqueur de l'infection à *Candida*. **Barros** et al et **Bilhan** et al [21, 27] utilisaient un seuil positif de plus de 400 UFC/ML. A ce jour, il n'existe pas de score consensuel pour une analyse quantitative des levures, permettant de déclarer le spécimen infecté par *Candida*.

La prolifération et la colonisation de *C. albicans* sur les surfaces des prothèses acryliques peuvent agir comme colonisateur précoce dans la formation de biofilms (remplaçant de nombreux *Streptocoques*) et peuvent faciliter l'émergence de microorganismes anaérobies [21].

La présence de microorganismes de type *Candida* ne semble pas être à l'origine de la stomatite prothétique, particulièrement chez les patients souffrant de stomatite prothétique type I de Newton [198]. Effectivement, plusieurs chercheurs pensent que la composante traumatique est un facteur déclenchant significatif, pourtant la plupart des lésions simples généralisées ou de type granulaire sont infectées par *C. albicans* [16, 75, 152].

Candida albicans et l'interaction bactérienne se sont révélés être des facteurs importants contribuant à la stomatite de la prothèse dentaire. Le biofilm prothétique se compose de microorganismes bactérien et fongique [54, 152, 193]. A J2 (deux jours de l'insertion en bouche d'une nouvelle prothèse), **Merdes** [152] a démontré un résultat fongique négatif qui est dû à une colonisation d'abord bactérienne par des *Streptocoques* surtout *Streptococcus mutans*, indispensable à la fixation des autres bactéries et du *Candida albicans* sur la surface acrylique, en revanche dès le 7^{ém} jour de l'insertion une forte dynamique des microorganismes sur les prothèses était constaté . Pourtant des chercheurs rapportent que les prothèses des sujets sains sans stomatite sont aussi infectées de *Candida* (présence de biofilm prothétique)[86, 158].

Dans 91 % de nos examens mycologiques, le *Candida* était identifié comme un organisme responsable de la stomatite prothétique cela rejoint l'avis de beaucoup d'auteurs [86, 207]. De nombreux

chercheurs ont signalé une augmentation significative de la prévalence et de la densité des espèces *Candida*, ainsi que la présence d'hyphes candidales indiquant une infection fongique chez les patients atteints de stomatite prothétique par rapport aux témoins appareillés qui n'en souffrent pas [117, 159]. Nous relevons dans la présente étude que 07 prothèses maxillaires (9%) ne développent aucune croissance de levures, de même pour **Figueiral** et al 2007 [86] qui enregistra 05 prothèses sans croissance fongique, a contrario **Naggal** et al 2014 [158] a pu isoler les *Candida* chez 100% des patients diagnostiqués avec une stomatite prothétique (Tableau n°XXXV). En effet, les microorganismes oraux changent après le port de la prothèse et cette condition favorise la croissance des organismes responsables de la stomatite de la prothèse [159].

Dans notre étude, l'infection par *Candida* montre majoritairement une implication fongique par une seule espèce dans 73% des cas, où la contamination était purement due à une espèce unique « contamination mono-espèce » rapportée comme prédominante dans plusieurs études mycologiques [20, 57, 75, 86, 202] à l'inverse, l'infection peut résulter de plusieurs espèces en association, on évoque ici la participation de deux et parfois trois espèces différentes « contamination pluri-espèces » faisant participer *Candida albicans*+ *Candida glabrata*, *C.albicans* + *C. tropicalis*, *C.glabrata*+ *C. tropicalis*, ou *C.albicans* + *C.tropicalis* +*C.glabrata* [20, 57] (Tableau n° XXXI). Ce résultat sans certitude statistique annonce que *Candida albicans* n'est pas le seul agent infectieux de la stomatite prothétique contrairement à ce qui est classiquement décrit dans ce contexte.

Le rôle du *Candida albicans* dans la pathogenèse de la stomatite de la prothèse est bien étudié et il a été démontré que diverses souches de *Candida* peuplaient la base de la prothèse et la muqueuse buccale [83, 93].

Dans notre étude les espèces *Candida* prédominantes identifiées, dans un ordre décroissant, étaient *Candida albicans* 59,1%, suivi de *Candida tropicalis* 9,9%, *Candida glabrata* 4,2%. Le *Candida krusei* n'était pas détectée dans notre étude. A ce titre, toutes ces espèces sont citées par d'innombrables études [27, 57, 66, 152, 202, 207, 227]. *Candida albicans* était l'espèce la plus fréquemment isolée dans notre enquête, et cette constatation s'est confirmée par d'autres études mycologiques, qui rapportent une prévalence de 40 à 60% (Tableau n°XXXV) [20, 68, 174, 175, 198].Grâce à cette constatation significative, les enquêteurs ont pu conclure l'existence d'une relation avérée entre le taux de *Candida albicans* et la stomatite prothétique, faisant de cette levure un facteur important dans le développement de la lésion. *Candida tropicalis* était la deuxième espèce à être détectée dans notre analyse, ceci rejoint les résultats de **Pereira** et al [175], et diffère des résultats précédents puisque le *Candida glabarta* était cité en deuxième place après le *Candida albicans* [27, 57, 66, 152, 202, 227].

Les trois espèces *Candida* sus-mentionnées peuvent infecter une muqueuse palatine seule (mono-espèces) ou en association (pluri-espèces).

La variabilité des fréquences du *Candida*, retrouvée dans les différentes études, peut être due aux différentes méthodes de collecte et de l'origine de l'échantillon (muqueuse ou prothèse ou les deux), à une population avec antécédents généraux.

Néanmoins, il a été démontré que *C. albicans* et *C. glabrata* sont capables de former des biofilms sur des substrats inanimés, ce qui peut constituer le fondement de leur co-agrégation, de leur colonisation et de leurs relations pathogènes potentielles[57].

La capacité élevée des espèces *Candida* à adhérer aux muqueuses serait accrue grâce à la transition des blastospores en hyphes, caractéristique spécifique au *C. albicans*. Les hyphes étaient détectés chez 100% des patients atteints de stomatite prothétique (région palatine). Il pourrait même pénétrer facilement dans les tissus au début de l'infection. Dans un environnement sain, les systèmes de défense de l'hôte devraient empêcher l'infection [27].

En effet, cette espèce est connue pour avoir un « phenotypic switching » élevé, qui lui permet de changer de morphologie, dans des conditions inhabituelles au commensalisme, en se transformant en pseudo-filaments et filaments mycéliens compatibles avec l'invasion de la muqueuse buccale

Les données de certaines études suggèrent que la SP est associée à une élévation des cytokines salivaires (IL-8 et d'IL-1 α) avec une augmentation de *Candida albicans* dans la salive sans aucune preuve d'inflammation systémique telle que mesurée par le taux sérique de protéines C-réactives CRP [21], et des numérations plus élevées des cellules inflammatoires chez les patients atteints de SP comparativement aux frottis des muqueuses des patients appareillés sains[9]. Les biopsies des muqueuses irritées montraient une invasion tissulaire par des hyphes candidals, sans différence significative avec les sujets sains[9].

Pereira et al[175] a comparé les facteurs de virulence des souches *Candida albicans*, et a pu conclure qu'elle : - était la seule espèce capable de sécréter toutes les enzymes ensemble,

- Produisait plus de tubes germinaux que *C. dubliniensis* (espèce presque semblable au *Candida albicans*),
- Formaient un biofilm
- Produisaient plus de facteurs de virulence (de la part des isolats *C. albicans* de type III)

Au cours des dernières années, **Gasparato et al** 2009 [91], **Zomorodian et al** 2011[227], et **Pereira et al** 2016 [175] avaient dénoncé la sous-estimation du *C. dubliniensis* en raison de l'utilisation d'une

procédure d'identification non fiable. En effet, les ressemblances phénotypiques étroites de *C. albicans* et *C. dubliniensis* avaient conduit à une identification erronée de ces espèces, seule la méthode de biologie moléculaire par amplification génique *in vitro* (PCR : Polymerase Chain Reaction) est capable de différencier entre ces deux espèces. En dépit de cela, le *Candida albicans* est resté l'espèce la plus communément isolée dans les cas de stomatites prothétiques [91, 175]. Dans certaines études, la variabilité de la souche *Candida* était plus grande, évoquant le *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida rugosa* [57, 86, 92, 122, 132, 152, 158, 180, 227].

Darwazeh et al et **Nagaral** et al rapportent une prévalence considérable de la contamination par *Candida* oral sur les doigts des sujets appareillés, voici une raison pour laquelle les patients porteurs de prothèses amovibles devraient être informés de l'importance d'une hygiène personnelle et prothétique appropriées et de la possibilité d'une contamination microbienne des parties du corps [66, 158].

En Résumé, cette étude rejoint les études faites sur la stomatite prothétique et vient encore appuyer le rôle important des levures dans la stomatite prothétique notamment du *Candida albicans* et précise qu'elle ne peut être le seul responsable. Elle montre clairement que les associations de levure sont non négligeables et peuvent laisser penser à un rôle synergique qui ne peut être confirmé dans ce travail.

Tableau n°XXXV : Tableau comparatif de nos résultats mycologiques avec les études (%)

	Levures absentes	Mono- espèce			Pluri- espèces				Autres levures (krusei, parapsilosis, guilliermondii.)	
		C.albi	C.tropi	C.glabr	C.albi+glab	C.alb+trop+glab	C.albi+tropi	C.tropi+glabr		
Budzt.Jorgensen 2000 [37]	30,2	69,8								-
		50,7	2,2	9,6	13,2	-	4,4	0,7	0,7	
Pires 2002 [180]	15,6	84,4								
		42,9			57,1					
		49,1	20,2	2,9	-	-	15,4	-	12,4	
Kazulak- Ozkan 2002 [122]	31,2	68,7								
		55,5	22,2	-	-	-	-	-	22,2	
Barbeau 2003[20]	-	41,2	-	-	68					
Webb 2005 [219]	-	34	4	33	9	8	8	4	-	
Emami 2005 [75]	-	77,7	-	11,1	-	-	-	11,1	-	
Figueiral2007[86]	7,1	81,4	-	7,1	-			1,4	-	
Coco 2008[57]	10,8	80,8								8,4
		75	2,7	22,3	-	-	-	-	-	
Costa 2008 [65]	-	55,7	1,4	-	-	-	8,6	-	-	
Bilhan 2009[27]	18,3	81,7	-	-	-	-	-	-	-	
Merdes 2009[152]	-	66,6	11,1	16,6	-	-	-	-	5,5	
Naik 2011[159]	-	54	-	-	-	-	-	-	-	
Savignac 2011[198]		45,8								
Zomorodian 2011 [227]		41,5	12,9	18,4	5,3	-	1,8	5,3	14,8	
Kabawat 2014 [114]	18,8	81,2								
		59	-	-	-	-	-	-	-	
Mantori 2012 [144]	00	100								
Altarawneh 2013[9]	-	73,2	Non albicans 26,8							
Loster 2016 [132]	37,8	61,3								
		61	5	19,5	-	-	-	-	14,5	
Pereira et al [175]	-	64,8	18,4	14,2	-	-	-	-	2,3	
Sbaa 2017 [202]	-	68,7				31,2				
		56,3	6,3	18,8	-	-	-	-	-	
Saadat 2017[193]	-	30,2	51,1	-	-	-	-	-	-	
Gauch 2018[92]	11	89								
		73,2	10,7	-	-	-	-	-	16	
Al-Sanabani 2018[7]	-	58,3	-	4,2	-	-	-	-	-	
Notre étude 2019	9	91								-
		27			73				-	
		59,1	9,9	4,2	14,1	5,6	1,4	5,6	-	

C.albi : Candida albicans

C.tropi : Candida tropicalis

C.glabr : Candida glabrata

- : non définit

4.1.6. Discussion de la relation entre les espèces *Candida* et le type de la stomatite

A travers les études déjà menées, la tendance de trouver un plus grand nombre de colonies de levure dans les stomatites plus étendues a été confirmée. Evidemment, une relation proportionnelle a été mentionnée entre le nombre de *Candida* isolées et l'intensité clinique de la stomatite prothétique [20,

21]. **Al Ma'ani** et al [6] trouve une présence conséquente des levures isolées dans le type II (près de 50% des levures) suivi du type III, et finalement du type I. **Bilhan** et al [27] notent un nombre élevé de colonies isolées des stomatites de type III par rapport à celui de type I, une autre différence significative du nombre de colonies de levures indiquée par **Emami** [75] entre les stomatites de type I-A et II-B, qui étaient 300 fois supérieure dans le type II-B.

Coco 2008 [57] prouve par son étude que les principales levures isolées étaient : le *Candida albicans* en grande majorité 100% dans les lésions de type II et III, *Candida glabrata* 80% dans les lésions de type II, et les deux espèces associées à 80% dans lésion de type III. Considérant aussi que **Emami** et al [75] constatent que le *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* contaminaient les prothèses qui recouvraient le type III. Par conséquent les biofilms mixtes (bi-espèces ou tri- espèces) de *C. albicans*, de *C. tropicalis* et de *C. glabrata* pourraient jouer un rôle important dans la pathogenèse des lésions de stomatite sévère chez les porteurs de prothèses.

Kulak-Ozkan et al 2002 a rapporté une relation significative entre la stomatite et la colonisation par les levures puisque les *Candida* étaient identifiées chez 100% des sujets avec une inflammation généralisée, et 37,5% des sujets présentaient une inflammation localisée [122].

De plus, **Sant'Ana** et al [196] ont rapporté que la présence de deux espèces ou plus chez un même patient peut le prédisposer à une stomatite récurrente. **Barbeau** et al [20] confirment quant à eux la participation du *Candida albicans* + autres *Candida sp* dans l'extension et la sévérité de la lésion stomatite (grade B), en revanche ils ne remarquent pas de relation entre la quantité et l'association avec les lésions avancées.

Même si les résultats ne sont pas complètement significatifs, nous pensons que la propagation de l'infection est causée par des souches mono-espèces, conformément aux études précédentes.

Pereira et al [175] ont confirmé une production des facteurs de virulence par les isolats de *Candida* provenant des lésions de type III supérieure à celle des isolats des lésions du type I et II des stomatites prothétiques.

4.1.7. Discussion sur le traitement de la stomatite prothétique

L'approche thérapeutique est complexe en raison de l'étiologie multifactorielle, et devrait être globale. Étant donné que le *Candida* est détecté dans la salive, beaucoup sur les surfaces prothétiques, et moyennement sur la muqueuse palatine, par conséquent, le traitement de la stomatite prothétique chez les patients sans antécédents généraux devrait débiter par l'assainissement des prothèses dentaires existantes et/ou la conception de nouvelles prothèses, le maintien d'une hygiène buccale adéquate et l'hygiène de la prothèse [155], en plus d'une thérapie antifongique qui est couramment préconisée [86,

207]. Si cette affection pouvait être traitée par des techniques appropriées de désinfection prothétique, qualifiées d'efficaces contre les *Candida*, les effets secondaires causés par la thérapie antifongique pourraient être éliminés.

Les auteurs s'accordent pour envisager un traitement prothétique et antifongique. Les antifongiques étant fongistatiques, la durée du traitement doit être de 2 à 3 semaines ; le traitement local doit toujours être utilisé en première intention avant le traitement systémique [183]. Il est rare qu'un traitement par voie générale soit indiqué; sauf chez un patient immunodéprimé, une mycose aiguë, ou en cas d'incapacité de l'application du traitement locale (sujet grabataire, handicapé) [183].

Selon **Figueiral** et al [87], le traitement systémique au Fluconazole avait amélioré la stomatite prothétique chez 77,8 % des patients, accompagné d'une réduction de 83,5 % de l'incidence de *C. albicans* par voie orale. Cependant, après 6 mois, la charge de *C. albicans* avait augmenté de façon significative et la gravité de la stomatite prothétique était similaire à celle observée avant traitement, 100 % des patients avaient manifesté une stomatite après 6 mois du traitement au Fluconazole. Ils en concluaient qu'il n'y a pas d'intérêt de prescrire le Fluconazole seul et qu'il présentait une bonne efficacité de traitement contre la stomatite prothétique à court terme, mais peut être associé à une émergence à long terme de résistance au Fluconazole.

Dans le cas du traitement local avec des antifongiques, une forte concentration et une rétention prolongée du médicament dans la cavité buccale sont cruciales pour une efficacité puissante contre la lésion [116].

L'utilisation préventive des antifongiques chez les patients immunodéprimés a favorisé l'apparition de souches résistantes au Miconazole [3].

Les instructions d'hygiène bucco-dentaire jouent un rôle important dans la réduction de la gravité de l'affection, mais elles doivent être utilisées en association avec le Miconazole gel oral pour obtenir les meilleurs résultats [6].

Le traitement devrait cibler l'élimination des *Candida* ; l'incorporation de la Nystatine (500 000 unités) dans les conditionneurs tissulaires, les bains de bouche désinfectants, l'immersion dans l'hypochlorite de sodium (0,5 %) et la désinfection des prothèses au micro-ondes ou par thérapie photo dynamique [207, 219] sont des méthodes souvent décrites dans les articles, qualifiées de moyens alternatifs dans la prévention et le traitement des stomatites prothétiques, puisqu'une réduction significative des *Candida* et des bactéries aérobies était constatée [208, 219]. Cela préviendrait et éviterait le recours à la thérapie antifongique, qui se voit indiquée que dans les cas de stomatites prothétiques sévères [207].

Les mesures d'hygiène prothétique (trempage dans une solution saline ou d'hypochlorite) avec une adaptation des prothèses avait réduit significativement les conditions clinique et mycologique des stomatites prothétiques[6]. La méta-analyse de **Hilgert** et *al* confirme que leurs résultats étaient favorables à l'utilisation de la Nystatine et des agents de désinfection (par immersion des prothèses dans des désinfectants tels que la Chlorhexidine, le Glutaraldéhyde), et ne montrait aucune différence entre l'utilisation du Miconazole sous forme de gel et son incorporation à un conditionneur tissulaire [104].

Une étude a montré qu'un traitement chirurgical des lésions de stomatites de type III avec renouvellement des prothèses permettait d'éradiquer l'hyperplasie papillaire, contrairement au seul renouvellement des prothèses [29].

A ce jour, rien ne prouve encore qu'une thérapie soit meilleure que toute autre pour le traitement de la stomatite prothétique ; les décisions thérapeutiques concernant les antifongiques ou les méthodes de désinfection devraient être prises en fonction de l'expérience clinique du praticien et des aspects liés au patient, comme l'observance et les effets indésirables possibles [104].

Etude Expérimentale

4.2. Discussion sur l'Etude Expérimentale

La stomatite prothétique étant une affection essentiellement d'origine fongique, et *C.albicans* est la levure la plus fréquemment isolée des lésions buccales des patients qui y sont atteints, ceci avait suscité notre intérêt à tester les produits sur *Candida albicans* cliniques issue des frottis des prothèses maxillaires, et référencées ATCC 10231 et ATCC 27980.

L'objectif de la deuxième partie de notre étude était d'évaluer les propriétés antifongiques de l'huile de thym, de girofle et de leur combinaison contre *C. albicans in vitro*. En outre, l'efficacité comparative de cette combinaison des deux huiles essentielles et du Miconazole a également été examinée. Les résultats démontrent clairement que les huiles de thym et de girofle, seules ou mélangées, peuvent agir comme de puissants agents antifongiques contre *C. albicans* et peuvent fonctionner de manière similaire aux antifongiques tels que le Miconazole.

4.2.1. Discussion sur l'activité antifongique des huiles essentielles étudiées

Les huiles de thym et de clou de girofle ont été retenues en raison des études antérieures, concernant l'analyse de leur composition par chromatographie en phase gazeuse -spectrométrie de masse (GC / MS), ainsi que pour leur efficacité antimicrobienne individuelle déclarée, en revanche très peu d'expériences rapportent des résultats sur leur combinaison, encore moins sur leur incorporation dans une préparation pharmaceutique.

4.2.1.1. Discussion sur la composition chimique des huiles essentielles

La composition des huiles essentielles d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, et la partie de la plante utilisée. Par conséquent, leurs propriétés antimicrobiennes varient également [39].

- ❑ **Discussion sur l'HE de Thym** : Selon les données de la littérature, les rendements en huile essentielle de *T. fontanesii* variaient considérablement, ce qui suggère la grande influence probable des conditions géographiques et climatiques. On peut conclure que *Thymus fontanesii* qui pousse dans l'Ouest Algérien est riche en huile essentielle.

Il ressort des données bibliographiques que l'huile essentielle des parties aériennes de *T. fontanesii* présente une variabilité chimique. L'ensemble des chercheurs rapportent un nombre de composés différents variant de 15 composés pour **Ghannadi** et al [96] à 47 composés pour **Dob** et al [69], ayant tous des composants communs comme : carvacrol , thymol, γ - Terpinène, para cymène, linalol et parfois l'eugénol.

Tous les échantillons d'huiles étudiés ont été caractérisés par la présence de monoterpènes oxygénés (carvacrol, thymol) associé à d'autres monoterpènes, à savoir : γ -terpinene, p-cymene et linalool, L'huile était caractérisée par une forte teneur en carvacrol (63,7-69,5%) [22, 156] ce qui s'accorde avec nos résultats (cf Tableau n° XXXVI).

A l'inverse, les parties aériennes des plantes récoltées dans les provinces de Sétif [96], Djelfa [69] et Bouira [149], ont produit une huile essentielle à chémotype thymol d'après les auteurs (29,3-67,8%,) suivie du γ -terpinène (15,9-21,7%) (cf Tableau n°XXXVI).

Par ces résultats, on peut conclure que l'huile essentielles de *Thymus fontanesii* de l'ouest algérien est à chémotype carvacrol.

Tableau n° XXXVI: Tableau comparatif de la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* étudiée en Algérie (en %).

Auteurs	Origine de la plante	Teneur en HE %	Nombre Composés	Monoterpènes oxygénés Phénols Alcool Terpénique				Monoterpènes Hydrocarbonés				Sesquiterpène Hydrocarbonés	
				Carvacrol	Thymol	Eugénol	Linalol	γ -Terpinène	Myrcène	α -Terpinène	<i>p</i> -Cymène	Methyl-thymol	β -Caryophyllène
Ghannadia et al. 2004 [96]	Sétif	1,9	15	1,7	67,8	-	0,3	15,9	0,2	0,1	13	tr	-
Dob et al. 2006 [69]	Djelfa	0,9	47	1,8	29,3	0,1	4,8	21,7	tr	1,9	15,9	11,4	2,9
Haddouchi et al. 2009 [100]	Mostaganem	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bekhchi et al. 2009 [22]	Tlemcen	5,20	28	68,1	0,6	-	3,26	7,24	1,32	1,14	7,5	-	0,76
Mebarki 2010 [149]	Bouira	3,9	27	20,2	58,2	-	5,53	9,79	-	-	0,79	0,13	2,17
Sidali 2016 [206]	Khemis Miliana	2,4	24	54,7	0,3	-	3,7	8,8	1,5	1,7	17,5	-	0,4
Mouhi et al. 2017[156]	Médeä	2,43	37	63,7	0,16	0,17	6,43	6,06	0,64	-	6,27	-	0,12
Nabet et al. 2017 [157]	Tiaret	5	27	67,6	0,9	-	2,2	13	1,8	2	7,4	-	-
Guernoug 2017 [15]	Ain Defla	3,6	25	24,6	36,6	-	4,60	4,64	-	-	8,57	1,6	1,86
Notre étude 2019	Tlemcen	4,31	27	56,3	10,7	-	3,1	11	1,5	1,3	10,5	-	0,6

tr : trace.

- : non définit.

□ **Discussion sur l'HE de Girofle** : Les rendements en huile essentielle des boutons floraux de *S. aromanticum* récoltés à Madagascar, au Nigeria et en Chine ont été compris entre 12%, 7% et 11,5% [17, 98, 188]. Plusieurs compositions ont été observées en ce qui concerne le contenu des trois composants principaux, principalement l'eugénol (45-88,5%), qui est de loin le composant principal, suivi de l'acétate d'eugényle (5,6-19,3%) et du β -caryophyllène (0,6-30%) [17, 49, 88, 98, 187, 210, 214]. Cependant, les travaux ne rapportent pas la présence du carvacrol, qui était retrouvé dans notre composition à 0,1% (cf. Tableau n°XXXVII).

Il convient toutefois de mentionner que les constituants des huiles naturelles diffèrent par leur rendement, leur concentration et leur quantité récupérée en fonction de plusieurs facteurs, notamment

les espèces végétales, la méthode d'extraction, les solvants utilisés et le temps d'extraction, qui peuvent à leur tour différer dans leur puissance antifongique.

Tableau n° XXXVII: Tableau comparatif de la composition chimique des de l'huiles essentielle de *Syzygium aromaticum* étudiée dans le monde (en %)

Auteur	Origine de la plante	Teneur en HE %	Nbre de composés	Phénylpropanoïdes		Sesquiterpènes hydrocarbonés		Monoterpènes oxygénés	Sesquiterpènes oxygénés
				Eugénol	Acétate d'eugényl	β -Caryophyllène	α -Humulène	Carvacrol	Oxyde de caryophyllène
Srivastava et al 2005 [210]	Inde	-	28	70	6	19,5	1,9	-	-
Jirovetz et al 2006 [113]	-	-	23	76,8	1,2	17,4	2,1	-	-
Chaieb et al 2007 [49]	-	-	36	88,58	5,62	1,38	0,19	-	-
Guan et al. 2007 [98]	Chine	11,5	11	57,24	19,37	17,5	2,3	-	0,49
Fu et al [88] 2007	Chine	-	11	68,52	10,15	19	1,85	-	1,13
Caillet et al 2007[39]	Madagascar	-	-	78	14	-	-	-	-
Ayoola et al. 2008 [17]	Nigeria	7	4	45	20	30	5	-	-
Teixeira 2013[214]	Indonésie	-	9	67,6	16,8	10,8	2	-	-
Razafimamonjison et al 2013 [187]	Madagascar	12	4	87,78	10,68	0,62	-	-	0,06
Gucwa et al 2018 [99]	-	-	14	68,24	-	14,47	9,09	-	-
Notre étude 2019	Indonésie	3,68	16	60,3	8,6	26,6	2,3	0,1	0,3

- : non définit.

4.2.1.2. Discussion de l'activité antifongique des huiles essentielles et de leur combinaison

En plus de la thérapie classique de la stomatite prothétique, qui est de plus en plus récente en ayant recours systématiquement à des agents de substitution produisant moins d'effets secondaires et présentant simultanément une activité antibactérienne et anti-inflammatoire. Il existe un grand nombre de préparations à base de plantes et de leurs huiles essentielles qui ont un effet anti-inflammatoire et comme antiseptiques naturels exprimant une activité antifongique et antibactérienne [155].

La plupart des résultats suggèrent que l'utilisation des huiles essentielles actives contre le *C. albicans*, seul ou associé à des antifongiques, pourrait être une alternative fiable, pour le traitement à des fins thérapeutiques et / ou préventives contre les candidoses buccales causées par l'utilisation de dispositifs prothétiques [45].

a. Discussion sur la sensibilité des souches et de leur diamètre d'inhibition

La sensibilité des *Candida albicans*, clinique et référencée, aux produits était testée par méthode de référence de diffusion sur disque sur gélose Sabouraud/Chloramphénicol, à l'exemple de plusieurs études [56].

Dans notre étude, nous avons constaté une zone d'inhibition de croissance de tous les *Candida albicans* autour des disques imprégnés de l'huile essentielle des parties aériennes de *Thymus fontanesii* de $IZ = 49,08 \pm 6,8$ mm ($p < 0,0001$). De même pour l'huile des clous de *Syzygium aromaticum* qui s'est montrée aussi active sur le *Candida albicans* avec une zone d'inhibition obtenue dans notre étude de $IZ = 31,4 \pm 3,04$ mm ($p < 0,0001$). Ce diamètre d'inhibition devance de loin celui du Fluconazole $IZ = 20,3 \pm 9,7$ mm. A partir de cela on peut conclure que ces huiles essentielles sont très actives sur ce genre de micro-organisme, et possèdent donc une puissante activité antifongique (cf. Tableau n° XXXIV).

De nombreux chercheurs se sont intéressés à l'activité antimicrobienne de ces deux HEs. L'activité antifongique de l'huile de *T. fontanesii* a été prouvée contre la souche *C. albicans* avec un diamètre d'inhibition IZ de 32 à 39 mm [69, 100] et $44,99 \pm 0,01$ mm [157]. Le diamètre de la zone d'inhibition de l'HE de *S. aromaticum* varie de 29,62 mm [137], $32,0 \pm 1,0$ mm [88] et 35 mm [17] (cf Tableau n° XXXVIII).

L'importante activité des huiles essentielles de ces deux plantes est due à leur richesse en composés phénoliques, qui sont les composés les plus antimicrobiens (carvacrol, eugénol). La plupart des composés des huiles essentielles sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols. Un rang d'activité des composés des huiles essentielles a été attribué sur un ordre décroissant : [22, 32, 39, 70, 84]

Phénols (carvacrol , eugénol, thymol) > Aldéhydes (cinnamaldéhyde) > Cétones (octanone) > Alcools (cinéole, linalol) > Esters (acétate d'eugényle) > Hydrocarbures (limonène).

Par conséquent, les huiles essentielles dont les phénols sont les principaux composés (forte teneur en phénols) expriment la plus forte activité contre les microorganismes, et leur spectre d'activité est le plus large (levures, bactéries à Gram positif et à Gram négatif), le carvacrol serait le plus actif de tous

les phénols [51]. Les huiles essentielles aux composés alcooliques prédominants sont légèrement moins actives[115].

Comme cela était déjà indiqué dans la littérature, nous avons considéré qu'une huile essentielle avait une action fongiotoxique, si son diamètre d'inhibition était supérieur à 16 mm [56, 134]. Ainsi, les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Syzygium aromaticum* agissent de façon très active sur les deux souches de référence de *Candida albicans* ainsi que sur toutes les autres souches cliniques, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 20 et 38,5 mm.

Cependant, l'huile essentielle à carvacrol s'est avérée être plus intéressante. En revanche, les souches *Candida albicans* se sont montrées plus ou moins sensibles au Fluconazole, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 9,3 et 19 mm.

Les résultats de ce travail montrent que les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Syzygium aromaticum* pourraient constituer une nouvelle classe d'agents antifongiques possibles pour le traitement et la prévention d'infections provoquées par *C. albicans*, entre autres la stomatite prothétique.

b. Discussion sur les concentrations minimales inhibitrices et fongicides CMI et CMF des huiles étudiées

L'activité antifongique des huiles essentielles vis à vis des *Candida albicans* cliniques et référencées était testée par méthode de référence de micro-dilution sur bouillon de culture Sabouraud [55], à l'exemple des études précédentes [169, 203], dans un but de mesurer les concentrations minimales inhibitrice et fongicide CMI et CMF.

Tous les échantillons d'huiles étudiés ont montré un effet inhibiteur remarquable sur les *C. albicans*. Dans notre expérience, nous avons pu obtenir une inhibition de croissance des *Candida albicans* proportionnelle aux concentrations de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, comparativement à l'inoculum témoin, jusqu'à obtention d'une action fongiostatique à la CMI = 0,125 µL/mL, et une action fongicide à la concentration suivante CMF = 0,25 µL/mL. On conclut que l'huile de Thym était active dose-dépendante sur toutes les souches du *Candida albicans*. L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est reconnue par plusieurs chercheurs comme étant un des produits naturels le plus actif contre le *Candida albicans* à très faibles concentrations [22, 69, 100, 101, 118, 130, 149, 157]. D'autres études confirment que le carvacrol est le composé qui lui offre cette activité [30, 51, 140, 165]. Certaines études ont montré des résultats différents de CMI de *T. fontanesii* à 0,25 µL/mL [130], d'autres résultats comparables à nos déterminations ont été observés dans une étude précédente rapportée une CMI à 0,11 µL/mL [157] (cf. Tableau n° XXXVIII).

Le carvacrol est aussi présent dans les huiles essentielles de l'origan, et de la sarriette, l'eugénol quant à lui figure dans la composition des huiles de feuilles de cannelle, et le thymol est un des constituants des genres de thym [39].

De même pour l'huile de *Syzygium aromanticum* qui a inhibé la croissance des levures à une concentration minimale inhibitrice de CMI=0,5 µL /mL et une absence totale de croissance de levures à une concentration minimale fongicide CMF= 1µL/mL. Ces résultats affirment que l'huile du clou de Girofle était active dose-dépendante sur toutes les souches du *Candida albicans*.

De nombreuses études rapportent aussi une très forte activité antifongique de l'huile essentielle de *Syzygium aromanticum* contre le *C. albicans* [17, 49, 73, 88, 133, 137, 177, 179], avec des valeurs se rapprochant aux nôtres, une CMI de 0,64 µL/mL, et une CMF entre 0,64 – 1,2 µL/mL [179]. L'eugénol étant également actif, certains chercheurs se sont intéressés à ce composé [34, 51, 138, 140, 179] (cf. Tableau n° XXXVIII).

En ce qui concerne la combinaison des deux huiles de *Thymus fontanesii* et *Syzygium aromanticum*, la valeur de la concentration minimale inhibitrice **CMI du mélange** (= 0,063 /0,25 µL/mL) ne correspondent pas aux valeurs des **CMI individuelles** des huiles séparément (CMI Thym = 0,125 µL/mL ; CMI Girofle = 0,5 µL/mL), mais à des valeurs inférieures à celle-ci d'un pallier.

Idem pour la valeur de la concentration minimale fongicide du mélange des deux huiles **CMF mélange** (= 0,125 /0,5 µL/mL) qui n'égale pas les valeurs des **CMF individuelles** des huiles séparément (CMF Thym = 0,25 µL/mL ; CMF Girofle = 1 µL/mL), mais à celle du pallier inférieur.

Chami et al [50] avaient testé *in vivo* (sur des rats de laboratoire immunodéprimés infectés par *Candida albicans*) l'activité anticandidale de l'eugénol et du carvacrol sur un modèle de candidose vaginale et ont pu conclure que l'eugénol et le carvacrol pourraient être un antifongique prometteur pour le traitement et la prophylaxie de la candidose vaginale [50].

Chami et al [51]avaient également évalués, *in vitro* et *in vivo*, l'efficacité thérapeutique du cravacrol et de l'eugénol dans le traitement de la candidose orale expérimentale induite par *Candida albicans* chez des rats immunodéprimés, et ont pu constater une réduction clinique et mycologique significatives.

La propriété antimicrobienne de la combinaison des huiles de clou de girofle et de thym n'a pas été signalé auparavant. Les huiles essentielles individuelles contiennent des composés complexes, qui lorsqu'ils sont combinés les uns avec les autres, peuvent entraîner des effets additifs, voir synergiques. Les résultats d'une étude de **Fu** et al ont montré que la combinaison des huiles essentielles de clou de

girofle (0,031%) et de romarin (0,125%) (CMI =CMF) présentaient un effet synergique contre le *Candida albicans* [88].

La variabilité entre les valeurs des CMI et des CMF des différentes études est indépendante de la méthode d'évaluation employée, et des souches de collection utilisées.

De plus, il a été montré que l'huile de thym et de girofle inhibe directement la germination et la formation de filaments ; en empêchant la transition de la forme levurique à la forme mycélium du *C. albicans*, sachant qu'il s'agit des deux phases indispensables à l'invasion des tissus [99, 136].

Ces deux huiles essentielles agissent en augmentant la perméabilité membranaire, induisant le collapsus du potentiel membranaire et en inhibant l'activité respiratoire conduisant ainsi à une perte de la viabilité cellulaire. Ces données sont importantes pour toute application de ces deux huiles comme antimicrobiens. Ils permettront aussi de proposer de possibles associations avec d'autres antifongiques [19].

Plusieurs chercheurs ont comparés l'activité antimicrobienne des huiles essentielles *T.fontanesii* et *S.aromaticum* intégrales avec leurs composés majoritaires seuls, puisque ces composants phénoliques, le carvacrol et l'eugénol sont connus pour posséder des caractéristiques fongicides [17, 49, 136], et ont conclu que l'HE était plus active que son composé phénolique utilisé seul, ceci en raison d'une synergie des différents composés se trouvant dans l'huile [136].

Une étude récente prouve une efficacité de l'HE de girofle deux fois supérieure à celle de l'eugénol seul, cela s'explique par l'existence d'une synergie entre les composants propre de l'HE [138].

Par ailleurs, l'action inhibitrice du p-cymène vis-à-vis de plusieurs microorganismes a été rapporté par divers études, ce monoterpène facilite le transport du composé phénolique de l'huile de thym (carvacrol), ainsi un effet synergique s'exerce en présence de ces deux composés [22].

Les résultats démontrent clairement que l'huile de thym et celle de girofle, seules ou mélangées peuvent agir comme un puissant agent antifongique contre *C. albicans* et peut fonctionner de manière similaire aux antifongiques tels que le Miconazole. L'utilisation concomitante d'huiles essentielles avec des antifongiques réduirait la CMI de l'agent antifongique et par conséquent ses effets secondaires [97].

Les activités antimicrobiennes et antioxydantes de ces huiles essentielles pourraient être dues, en partie, à la présence de plusieurs composés, tels que le carvacrol, le thymol, l'eugénol, dans leurs compositions chimiques [214].

Malgré ces recherches sur l'efficacité antifongique de l'huile essentielle de cette plante algérienne endémique, qui est le *Thymus fontanaesii*, aucune d'entre elles n'a débouché sur une proposition d'une préparation phytopharmaceutique.

Tableau n° XXXVIII : Comparaison des paramètres antifongiques des huiles essentielles de Thym et de Girofle.

Auteurs	<i>HE Thymus fontanesii</i>			<i>HE Syzygium aromaticum</i>			Combinaison girofle /thym	
	IZ (mm)	CMI	CMF	IZ (mm)	CMI	CMF	CMI	CMF
Hammer 1999 [101]	-	0,03 %	-	-	-	-	-	-
Manohar et al 2001[136]	-	Caracola 0,25mg/mL	Carvacrol 0,5mg/mL	-	-	-	-	-
Chami et al 2005[51]	-	Carvacrol 0,1%	Carvacrol 0,1%	-	Eugenol 0,2%	Eugenol 0,2%	-	-
Dob et al 2006 [69]	32	0,2 µL/mL	-	-	-	-	-	-
Fu et al 2007 [88]	-	-	-	32,0 ± 1,0	0,125 %	0,25%	-	-
Maarif 2008 [133]	-	-	-	-	0,63%	-	-	-
Ayoola et al 2008 [17]	-	-	-	-	0,067 mg/mL	-	-	-
Nzeako et al 2008 [167]	-	-	-	-	2,5 10 ³ µg/mL	2,5 10 ³ µg/mL	-	-
Pinto 2009 [180]	-	-	-	-	0,64 µL/mL	0,64 – 1,2 µL/mL	-	-
Kouidhi 2010 [121]	-	-	-	18,4 ± 0,5	-	-	-	-
Liu et al 2012 [130]	45	0,25 µL/mL	-	-	-	-	-	-
El bouri 2014 [73]	-	-	-	-	0,25 – 0,5 µL/mL	-	-	-
Labib et al 2015 [123]	-	0,78×10 ³ µg/mL	-	-	3,2×10 ³ µg/mL	-	-	-
Sidali et al 2017 [207]	42 ± 0,2	0,97 mg/mL	-	-	-	-	-	-
Nabet et al 2017 [157]	-	0,11 µL/mL	-	-	-	-	-	-
Gucwa 2018 [99]	-	2,5 %	-	-	0,16%	-	-	-
Lee 2018[128]	-	-	-	-	3,13 mg/mL	6,25 mg/mL	-	-
Notre étude 2019	49,08 ± 6,8	0,125 µL/mL	0,25 µL/mL	31,4 ± 3,04	0,5 µL/mL	1 µL/mL	0,25 /0,063 µL/mL	0,5 /0,125 µL/mL

4.2.1.3. Discussion sur la comparaison *in vitro* de l'efficacité de notre gel buccal et celle du Miconazole

a. Discussion sur la comparaison de l'activité anti-fongique

L'activité antifongique de ces huiles était testée et comparée à l'activité antifongique du Miconazole en utilisant la méthode de microdillution.

L'efficacité de l'huile essentielle sur les souches fongiques utilisées était déterminée par l'observation d'une croissance de levures ou de leurs inhibitions, après une incubation de 48h.

Notre gel était aussi efficace que le Miconazole sur toutes les souches testées, le résultat annoncé était une croissance non dénombrable sur le témoin et sur le gel base « excipient », et une inhibition totale (on/off) sur notre gel et sur le Miconazole.

Labib et al avaient préparé un gel à base d'huiles essentielles de Thym (à chémotype thymol) et de Girofle, et se sont intéressés à la mucoadhésion, qui d'après eux constitue un paramètre important pour la rétention *in vivo* de la préparation dans la cavité buccale, ce qui augmenterait et prolongerait l'efficacité du gel [123].

Bakhshi et al ont comparé une solution aqueuse d'ail en essai clinique randomisé en double aveugle, avec un bain de bouche à la Nystatine chez les patients atteints de candidose buccales. Après une application locale de quatre semaines des deux solutions par voie orale, trois fois par jour, les chercheurs ont remarqué que les paramètres cliniques s'étaient considérablement améliorés chez les deux groupes de traitement, de façon significative [18].

Dans une autre étude, l'huile d'origan était incorporée à un conditionneur, en essai clinique, et a permis la réduction du nombre de levures comparées au témoin. L'effet antimicrobien de l'huile serait basé sur l'inhibition de la germination et la formation de filaments du *Candida*, en présence du carvacrol et du thymol [177].

b. Discussion de la comparaison de l'efficacité anti biofilm

Les biofilms prothétiques sont très structurés et complexes, formés par des communautés de microorganismes d'une même espèce ou d'espèces différentes maintenues dans une matrice polysaccharidique autoproduite qui se développent à la surface de la muqueuse orale et de la prothèse dentaire. Le *Candida albicans*, levure décrite comme étant une souche invasive, produit plus de biofilm en termes de poids sec avec une architecture plus complexe comparé aux autres *Candida glabrata*, et *C. tropicalis*; moins de 10% des souches de *C. albicans* en produisent contre 80 % des souches non albicans [3].

Les levures comprises dans un biofilm réagissent différemment des souches planctoniques (libres), par leur architecture cellulaire dense, une sécrétion significative des molécules du « Quorum Sensing » : dont le farnésol qui inhibe la formation des filaments tandis que le tyrosol la stimule, ces deux activités sont nécessaires à la croissance et à la maturation des biofilms [3], l'activité de la pompe d'efflux, les cellules persistantes, la présence de la matrice extra-cellulaire, les réponses au stress et la surexpression des cibles du médicament [200].

En fournissant aux micro-organismes la capacité de communiquer et de coordonner la croissance de leur population par l'intermédiaire de la sécrétion des molécules de signalisation, la densité cellulaire peut être considérée comme une clé du processus de détection du « quorum sensing » où on identifie le farnésol comme molécule qui inhibe le stade de transition hyphal de *C. albicans* et augmente l'adhésion [185]. Le tyrosol étant la deuxième molécule du « quorum sensing » identifiée dans le *C. albicans*, favorise la formation des tubes germinatifs, améliore la phase initiale de formation du biofilm, et peut également inhiber l'activité du farnésol, contrôlant ainsi l'activité des cellules de la population.

Le biofilm prothétique débute sa formation dans les deux heures qui suivent l'insertion prothétique en bouche, et il est mature au bout de 72 heures (entre 2 et 7 jours)[152, 202]. A deux jours de l'insertion, le biofilm prothétique est installé, **Merdes** rapporte une présence bactérienne de *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp* et *Neisseria*, avec une colonisation des prothèses par les levures était notée à J7 [152].

Les multiples facteurs spécifiques du biofilm précédemment cités contribuent simultanément à la résistance des levures aux antifongiques à travers différents mécanismes, en effet tous les types de biofilms fongiques ont des propriétés distinctes de celles des cellules de levure planctoniques et augmentent la résistance aux antifongiques jusqu'à 1000 fois[185, 203]. La découverte de nouvelles stratégies pour surmonter ces communautés microbiennes avait donc fait l'objet de recherches approfondies.

Précisant-le, un produit antimicrobien n'est pas forcément un produit anti-biofilm, les communautés de levures disposées en biofilm sont connues pour être résistantes aux produits antifongiques, en raison des facteurs susmentionnés, et donc si notre produit s'est avéré être un antifongique efficace, nous devons tester son efficacité sur un biofilm à *Candida albicans* formé sur des échantillons de résine acrylique. Nous avons tenté de reproduire un biofilm à *Candida albicans in vitro*, sur des spécimens de résine acrylique plongés dans un bouillon de culture afin de booster les levures.

L'huile essentielle de girofle a également montré une excellente activité antimicrobienne dans les études, l'eugénol représente un composé bioactif très intéressant à large spectre contre les cellules planctoniques et sessiles appartenant à des microorganismes pathogènes humains [138].

Des produits désinfectants comme les bains de bouche permettaient l'inhibition de l'adhérence des *Candida albicans* et sont préconisés dans le nettoyage des prothèses [110].

Les antimycosiques doivent être réservés au traitement des patients infectés : ils sont moins actifs contre les biofilms à *Candida sp* que sur les levures en suspension et ils pourraient provoquer l'apparition de souches résistantes s'ils sont appliqués tous les jours sur les prothèses dentaires pour prévenir la colonisation par les levures.

Serra et al a pu montrer par son étude, que plusieurs huiles essentielles commerciales, et le linalol, le Triclosan et la Chlorhexidine avait une activité antifongique contre les *C. albicans* planctoniques, et que seulement quelques composés : Chlorhexidine, cannelle, linalol, géranium, étaient également actifs contre les biofilms à *C. albicans*, qui sont habituellement difficiles à inhiber efficacement [203].

Sur la base des problèmes évoqués ci-dessus en ce qui concerne le traitement antifongique, l'une des options est la combinaison de médicaments. L'utilisation de plus d'un médicament peut accroître l'efficacité en raison de la possibilité d'agir sur plus d'une cible ; en outre, la toxicité est réduite puisque les concentrations utilisées sont moindres [200].

Le biofilm que nous avons tenté de reproduire est un biofilm à *Candida albicans*, qui diffère de loin du biofilm prothétique, constitué de plusieurs bactéries Gram positif et négatifs, de bacilles et de levures *Candida sp*, c'est la raison pour laquelle des études *in vivo* sur l'efficacité anti-biofilm sont nécessaires plus poussées, afin de confirmer cette efficacité.

Les molécules de source naturelle à activité antifongique sont également décrites comme ayant une activité synergique *in vitro* avec celle de l'antifongique, réduisant la concentration des deux substances. L'utilisation de la substance naturelle avec des antifongiques médicamenteux a permis d'inhiber les pompes d'écoulement et la morphogénèse chez *C. albicans* résistant aux Fluconazole et de potentialiser son action[200].

Gebremedhin et al ont aussi démontré l'efficacité du Miconazole contre un biofilm à *Candida albicans* développé sur des disques de résine poly-méthacrylate de méthyle thermo durcis et traités au Miconazole (0,5 - 96 µg/mL), par la méthode de micro dilution. La CMI du Miconazole variaient de 0,016 à 32 µg/mL, et l'inhibition la plus élevée était observée à 96 µg/mL de Miconazole[94]. Une forte inhibition du métabolisme de *C. albicans* et un effet destructeur ont été prouvés pour le Miconazole CMI₅₀ = 19,72 µmol /L [106].

Namala et *al* se sont intéressés à l'effet des nettoyants pour prothèses dentaires à base d'extraits végétaux de thym sur les caractéristiques physiques et superficielles des résines de base des prothèses dentaires, et a pu conclure que le nettoyant pour prothèses à base d'huile essentielle de thym avait préservé l'état de surface des résines de base des prothèses mieux que les autres nettoyants disponibles sur le marché qui présentaient une rugosité de surface plus élevée [160].

De nombreux efforts ont été déployés pour découvrir de nouveaux composés antimicrobiens provenant des plantes. L'utilisation de médicaments à base de plantes médicinales à une longue histoire dans la population mondiale dans le traitement de différentes maladies. On a découvert que de nombreuses plantes possédaient des propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes.

Une autre étude déclare que les huiles essentielles de *Origanum vulgare* (à chémotype thymol ou carvacrol) et de clou de girofle sont des agents antifongiques puissants contre les espèces orales de *Candida*, et qu'ils peuvent être utilisés séparément ou en synergie contre la stomatite prothétique. Les échantillons frais de l'origan ont donné de meilleurs résultats que les échantillons stockés, et les deux huiles ont montré une meilleure activité antifongique que la Nystatine, Amphotericine B et le Fluconazole [26].

4.2.1.4. Discussion sur la toxicité cellulaire de notre gel buccal

Dans notre étude, le gel buccal préparé à partir des huiles essentielles de *T.fontanesii* et de *S.aromaticum* était non toxique sur les cellules du conjonctif de la muqueuse orale humaine :les fibroblastes gingivaux, ce qui rejoint l'avis de plusieurs chercheurs, par le fait que les doses employées sont nettement inférieures aux doses toxiques.

Liu et *al.* [130]ont affirmé que la dose semi létale d'un produit naturel isolé à partir d'une plante aromatique était beaucoup plus élevée que la dose quotidienne administrée pour les expériences d'efficacité pour le traitement des infections à *Candida*.

Peu d'enquêtes ont étudié les effets cytotoxiques de ces huiles ; selon une étude sur d'autres huiles essentielles de la cannelle et du géranium comportaient une cytotoxicité dose-dépendante et temporelle, réduisant de moitié la prolifération des fibroblastes à des concentrations inférieures à leurs CMI (concentrations inférieures à celles requises pour inhiber la croissance de *C. albicans*) [203].

Selon l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques, une huile est considérée comme toxique si sa Dose Létale par voie orale (DL₅₀) se situe entre 300 et 2000 mg / kg. La toxicité pourrait être due à la haute biodisponibilité des composés toxiques ,plus particulièrement des composés phénoliques, avec un accent particulier sur le thymol et le carvacrol où ces deux constituants présentent un degré de toxicité élevé [206].

Lee et al ont étudiés la toxicité d'un gel mélangé à l'huile de girofle sur des cellules fibroblastes de souris, et ont conclu que son utilisation en tant qu'agent antifongique était sans danger à la concentration 0,313% [128].

L'huile essentielle de clou de girofle est généralement reconnue comme une substance sans danger lorsqu'elle est consommée à des concentrations inférieures à 1500 mg / kg. D'autre part, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a établi que la quantité journalière acceptable de clou de girofle par jour est de 2,5 mg / kg de poids chez l'homme [61]. L'eugénol est facilement absorbé lorsqu'il est administré par voie orale, atteignant rapidement le plasma et le sang avec des demi-vies moyennes de 14 h à 18 h [61].

Il convient de préciser que certains résultats déclaraient que les huiles essentielles étaient cytotoxiques, il s'agit là d'un test de cytotoxicité réalisé généralement en culture 2D (deux dimensions : culture en couches de cellules unitaires bidimensionnelles cultivés sur une surface artificielle plane, de type boîte de Pétri ou plaque de culture cellulaire), et donc qui diffère complètement des conditions *in vivo*.

La concentration optimale des huiles de thym et de clou de girofle était déterminée par une évaluation de la sécurité, qui représentaient une faible CMI et un faible taux de CMF. Pour ces huiles naturelles, outre leurs effets antimicrobiens sur *C. albicans* de la flore buccale, d'autres études devraient être porter sur l'analyse de leur efficacité contre les bactéries, ainsi que sur l'évaluation de l'innocuité *in vivo*, afin de mettre au point un produit naturel inoffensif et antimicrobien.

4.3. Validité interne : Biais et limites de notre étude

Le questionnaire était facile dans la compréhension, évitant ainsi le biais d'information, une explication était fournie pour les questions difficiles à comprendre par les personnes âgées (peut être ignorantes), et les questions ne sollicitaient pas la mémoire ni le passé lointain.

4.3.1. Points forts de notre étude

- Notre échantillon de 78 patients était exhaustif, tous les patients édentés totaux appareillés, présentant une SP et en bonne santé, étaient recrutés sur trois années de recherche consécutives, ce qui correspond aux modèles de grands échantillons de 30 à 50 patients selon les écoles.
- La facilité clinique du diagnostic de la stomatite prothétique.
- La standardisation des techniques d'identification des levures.
- La normalisation des méthodes d'obtention des concentrations minimales inhibitrices et fongicides.
- La réalisation de l'ensemble des manipulations par le même investigateur éliminant un biais de mesure.

- L'utilisation des appareils calibrés.

4.3.2. Points faibles de notre étude

- La présence d'un biais de prévarication qui est inévitable en raison des questions à visée subjective et non objective, les patients peuvent par omission involontaire voire par mensonge donner de fausses déclarations au sujet de l'hygiène, du port nocturne, et de la conservation des prothèses.

- Le peu d'études expérimentales qui se sont intéressées au *Thymus fontanesii* (plante endémique à l'Algérie) nous a limité dans la comparaison de nos résultats.

4.4. Validité externe

On peut juger que notre étude possède une validité externe car nos résultats se rapprochent des résultats publiés à l'échelle internationale.

Dans la revue de littérature, la plupart des travaux des essais thérapeutiques *in vitro*, leur méthodologie était semblable à celle de notre étude, idem pour le critère de jugement mesuré sauf pour quelques études qui différaient.

5. Recommandations Thérapeutiques de la Stomatite Prothétique

La stomatite prothétique est une maladie qui nécessite une attention particulière de la part des patients porteurs de prothèses eux-mêmes ainsi que des praticiens, en leur introduisant un programme spécifique d'éducation thérapeutique [119].

Nous avons pensé à des recommandations préventives et curatives qui peuvent s'intégrer durant les différentes phases du plan de traitement prothétique (Figure n°91)

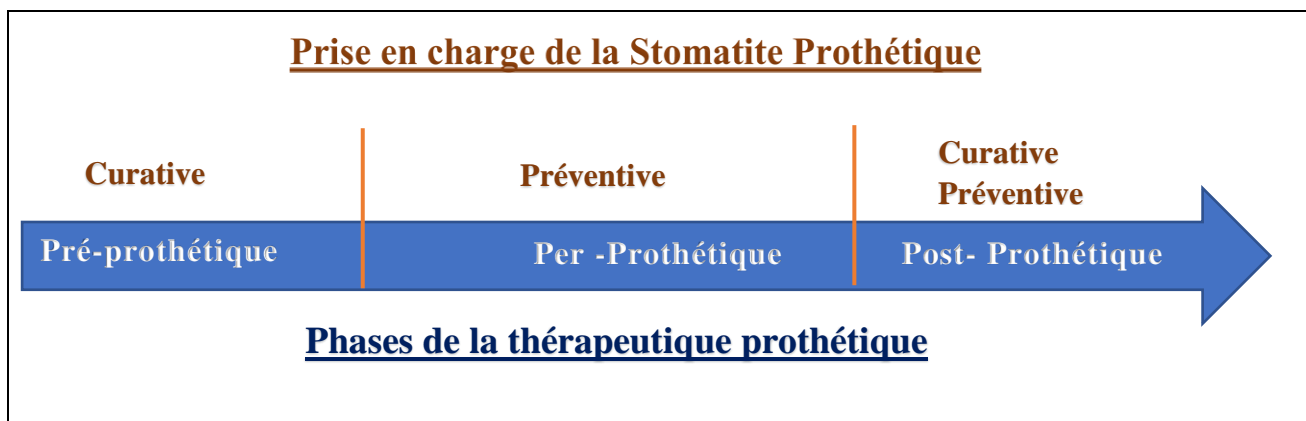


Figure n°91 : Indications du traitement et de la prévention de la stomatite prothétique durant les phases du traitement prothétique.

5.1. Recommandations préventives au patient de la stomatite prothétique

Les praticiens devraient donner des instructions adéquates au patient, en matière de soins à domicile lors de la mise en bouche de la prothèse, ainsi que des rendez-vous de contrôles réguliers pour une adaptation optimale, une évaluation des lésions buccales et de la perte osseuse, et pour évaluation de l'état de santé bucco-dentaire.

La prévention s'établit à la phase du traitement per-prothétique et post-prothétique :

5.1.1. Lors des étapes de la réalisation prothétique

- Enregistrement précis des empreintes des tissus supports sous pression occlusale.
- Etablissement d'une occlusion équilibrée en relation centrée.
- Absence de contact des dents antérieures.
- Thermo-polymérisation des bases en résines, et réparation des fractures avec une résine thermo-polymérisée.
- Traitement et/ ou équilibrage de toute maladie systémique sous-jacente (Diabète)
- Sevrage du tabagisme.

5.1.2. Consignes post- prothétiques

- Adopter une hygiène bucco-prothétique méticuleuse, par un nettoyage (brossage) régulier des prothèses dentaires après chaque repas avec une brosse à prothèse douce (renouvelable tous les trois mois) et du savon neutre.
- Désinfection des prothèses dentaires en les trempant toute une nuit dans des solutions nettoyantes ou des bains de bouches contenant du peroxyde alcalin ou du gluconate de chlorhexidine, ou en les immergeant dans de l'hypochlorite de sodium à 0,05% pendant 10 minutes, 10 gouttes d'eau de Javel dans un contenant de 500 mL rempli d'eau.
- Retrait des prothèses amovibles pour au moins huit heures par jour (repos pour les tissus) en les conservant au sec dans des boîtes réservées.
- Désinsertion des prothèses de la bouche en utilisant une serviette jetable et lavage minutieux des mains après la manipulation des prothèses, et plusieurs fois par jour.
- Brossage doux du palais avec une autre brosse à dent souple, en utilisant des mouvements de vas et vient, de gauche à droite et d'arrière en avant pendant 1 minute, en plus d'un massage de 15 à 20 minutes par pression croissante (stimulation de la kératinisation).
- Désinfection des brosses au micro-onde en les trempant, une fois par semaine, dans un verre d'eau pendant 1 minute à 600 watts, ou 30 min dans un bain de bouche habituel.
- Désinfection des prothèses amovibles par irradiation au micro-ondes pendant trois minutes à 650 W, trois fois par semaine, en immergeant la prothèse dans 200 mL d'eau [76].
- Désinfection des prothèses amovibles par Thérapie Photodynamique Antimicrobienne (TPA) qui active un colorant spécifique photosensibilisateur, par une source lumineuse (400-700 nm) produisant des molécules réactives de l'oxygène mortelles pour les microorganismes[1].
- Désinfection des prothèses, chaque année par un dentiste, en utilisant des nettoyeurs soniques pour minimiser le biofilm accumuler par le temps.
- Prévision des visites régulières chez le dentiste, chaque année.
- Rebasage des prothèses afin de diminuer les traumatismes causés par celles-ci.
- Renouvellement des prothèses acryliques tous les 5ans, aucune prothèse amovible n'est définitive, il s'agit d'une prothèse d'usage.

5.2. Recommandations curatives au clinicien de la stomatite prothétique

Une approche thérapeutique globale est nécessaire pour traiter la stomatite prothétique, sa prise en charge est curative durant la phase thérapeutique pré prothétique.

Dans la plupart des cas, l'élimination des facteurs traumatiques, des mesures d'hygiène bucco-dentaire adéquates et l'administration de médicaments antimycotiques locaux permettent la guérison des lésions inflammatoires.

Selon les nouvelles données, avant de prescrire un traitement médicamenteux, il faudrait éliminer les facteurs responsables de la stomatite prothétique en optimisant l'hygiène buccale et en ajustant les prothèses. Le traitement antifongique seul ne serait pas efficace sans l'adoption des mesures d'hygiène buccale et prothétiques.

- Une mise en condition tissulaire, avec adjonction ou non de produits antifongiques.
- Rebasage ou réfection des prothèses existantes, avec rééquilibration occlusale ou un remontage des dents.
- Renouvellement du traitement prothétique si nécessaire, ou encore envisager la réalisation d'une prothèse implanto-satbilisée.
- Prescription des antifongiques topiques comme :
 - **Nystatine 100 000 unités/g en crème** : application sur la l'intrados de la prothèse trois fois par jour, pendant 15 jours. Ou en suspension orale 100 000 unités/mL, pour immersion de la prothèse pendant la nuit.
 - **Fungizone 10% suspension buvable** : trois applications par jours, en bain de bouche pendant 15 à 21 jours.
 - **Miconazole 2% gel buccal** : une application sur la muqueuse palatine et sur l'intrados prothétique trois fois par jours pendant 21 jours.
- L'administration systémique de capsules de Fluconazole (50 mg par jour pendant 14 jours) ou de capsules d'Itraconazole (100 mg par jour pendant 15 jours) sont utilisés qu'en dernier recours, ou chez un patient immunodéprimé avec stomatite dentaire récidivante.
- Contrôler l'état de surface de la base de la prothèse (présence de porosités)
- Un traitement préventif par les antifongiques est recommandé aux patients immunodéprimés tels que les cancéreux sous chimiothérapie.

La conduite à tenir devant les types de la stomatite prothétique est la suivante (cf. Tableau n° XXXIX)

Type I : essentiellement traumatique → pas d'antifongique

Type II : prescription d'antifongiques → éviter à tout prix la progression de la lésion vers le type III

Type III : renouvellement prothétique systématique → la prothèse constitue un réservoir de germes difficile à détruire.

Tableau n°XXXIX: Propositions (recommandations) thérapeutiques selon les grades de la stomatite prothétique.

Types de SP	Patient sain		Patient immunodéprimé (sous chimio, HIV)
	Prothèse en bon état	Prothèse en mauvais état	
Type I	-Motivation aux mesures d'hygiène bucco- prothétique -Retrait nocturne + Conservation au sec. Désinfection des prothèses. - Pas de prescription d'antifongiques → Réévaluation	-Application des mesures d'hygiène buccale. - Déconseiller le port prothétique et renouvellement des prothèses. - Pas de prescription d'antifongiques → Réévaluation	- Application des mesures d'hygiène bucco-prothétique. -Prescription systématique d'un antifongique local
Type II	-Motivation aux mesures d'hygiène bucco- prothétique. - Désinfection des prothèses. -Retrait nocturne + conservation au sec. - Prescription d'antifongique local pdt 3semaines	-Application des mesures d'hygiène buccale. - Déconseiller le port prothétique et renouvellement des prothèses. - Prescription d'antifongique local pdt 3semaines	-Prescription d'antifongiques topiques et per os.
Type III	- Motivations à toutes les mesures bucco-prothétiques -Prescription d'antifongique local pendant 3semaines -Renouvellement systématique des prothèses quel que soit son état. -S'il y a récurrence, demander une sérologie, et rechercher une maladie systémique (diabète)		-Orientation spécialisée du patient (Gastro-Entérologie, Infectieux)

CONCLUSION

Conclusion

Les prothèses complètes constituent des corps étrangers placés dans la cavité buccale qui sont généralement acceptés par les tissus dans une large mesure qui est surprenante. En même temps, il convient de préciser que les prothèses complètes ne sont pas des dispositifs inoffensifs comme nous pensons souvent être, le succès d'un traitement par prothèse complète exige du patient non seulement une habileté mécanique et la compétence, mais aussi une connaissance de la part du praticien de la physiologie et de l'anatomie, ainsi qu'une compréhension des changements pathologiques possibles qui risquent survenir après le traitement.

A travers cette étude, nous avons rencontré une prévalence de la stomatite prothétique qui nous interpelle (32,8%), malheureusement ce problème de santé public n'attire pas trop l'attention des professionnels, puisqu'il n'existe pas un consensus sur la prise en charge ou sur la prévention de cette lésion candidosique souvent récidivante. Voilà pourquoi il est du devoir du praticien de sensibiliser davantage les patients au suivi du traitement prothétique par les visites périodiques. Le *Candida albicans* était isolé sur 59% des prothèses maxillaires.

L'application des substances non synthétiques et complètement naturelles, telles que les huiles essentielles, peut être suggérée comme une alternance prometteuse pour le traitement des stomatites prothétiques. Considérant la résistance croissante des champignons contre les agents antifongiques, la formation de biofilms *Candida* et l'attitude généralement positive des patients pour le traitement à base de plantes, les produits naturels pourraient être les substitutions alternatives de substances chimiques avec moins d'effets indésirables sur les humains.

Effectivement, les huiles essentielles de thym (récolté dans la région de Tlemcen) et de girofle étudiées dans notre travail de recherche sont dotées d'un puissant effet antifongique puisqu'elles ont démontré des concentrations efficaces et minimales de l'ordre de $0,125 \mu\text{L.ml}^{-1}$ / $0,5 \mu\text{L.ml}^{-1}$ respectivement sur le *Candida albicans*. Parallèlement notre « gel CMF » qui est constitué de ces huiles essentielles était aussi efficace sur le *Candida albicans*, que le Miconazole, le Gold Standard des traitements antifongiques. Par ailleurs, nous avons pu prouver que cette préparation de gel était non toxique sur des cellules humaines.

Cependant, d'autres recherches sont nécessaires dans ce domaine afin de clarifier le mécanisme antifongique de ces extraits dans des conditions différentes. De plus, d'autres études cliniques sont nécessaires avant leur utilisation. L'opinion actuelle est que pour leur emploi sécuritaire, il est important d'avoir des préparations normalisées de médicaments à base de plantes médicinales, qui peuvent être moins toxiques que beaucoup de médicaments synthétiques.

Les produits naturels ont un effet antimicrobien aujourd'hui reconnu *in vitro*, et même clinique pour certaines huiles essentielles, par le biais de nos recherches fondamentale et pré-clinique (expérimentations au laboratoire) qui constituent des étapes préliminaires d'une recherche avancée, il sera souhaitable d'envisager plus d'essais cliniques *in vivo* (sur modèle animal) et /ou sur patients, afin de confirmer leur activité fongiotoxique.

Perspectives

Ces résultats dans le domaine de la recherche des agents antimicrobiens naturels sont prometteurs et offrent de nombreuses perspectives, il serait intéressant de poursuivre ce travail selon plusieurs axes :

➤ Perspectives d'action en santé publique :

- Etablir la prévalence de la stomatite prothétique chez un échantillon de patients plus exhaustif, incluant des patients diabétiques, immunodéprimés et même institutionnalisés.
- S'intéresser et s'occuper plus de la branche de la Gérodentologie dans notre pays.
- Apporter un certain intérêt à la prothèse complète implanto-portée qui pourrait paraître parmi les solutions d'éradication de la stomatite prothétique puisque le traumatisme muqueux est nettement réduit, même si la formation d'un biofilm sur le titane des implants risque d'être à l'origine d'une péri-implantite.

➤ Perspectives de recherche :

- Réaliser une étude comparative de la récurrence des stomatites prothétiques après traitement phytothérapeutique et traitement par agents médicamenteux.
- Prévoir dans la même optique, des travaux *in vitro* plus poussés qui permettent de confirmer l'inhibition de la formation du biofilm par les huiles essentielles et leur efficacité anti-biofilm, qui rappelons-le est indépendante de l'effet antifongique, une fois que celui-ci soit formé, afin de développer un produit nettoyant pour prothèses dentaires à base de ces huiles essentielles.

- Evaluer des effets synergiques possibles entre les HE et/ou leurs composants et entre les huiles essentielles, et les molécules synthétiques.
- Moduler les volumes ainsi que les concentrations des huiles de thym et de girofle qui permettrai de rechercher un synergisme avec des doses minimales.
- Etudier l'action préventive de ces huiles essentielles avant l'installation d'une stomatite prothétique.
- Tester l'activité anti-inflammatoire de ces huiles essentielles.
- Développer un produit phytothérapeutique après obtention d'une autorisation ministérielle et éventuellement dépôt de son brevet.
- Réaliser un screening (criblage, trie) phytochimique des extraits des plantes afin de caractériser les fonctions chimiques qui expliqueront l'effet thérapeutique. (Établir une relation structure-activité).
- Étudier la stabilité du gel buccal en temps réel afin de déterminer la durée de validité (date de péremption) et les conditions de sa conservation.
- Entreprendre une étude de toxicité *in vitro* sur différentes lignées cellulaires et *in vivo* sur des modèles utilisant les animaux, afin de déterminer les doses thérapeutiques, pour ensuite pouvoir les tester en essai clinique sur patients.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Abduljabbar, T., et al., *Efficacy of photodynamic therapy in the inactivation of oral fungal colonization among cigarette smokers and non-smokers with denture stomatitis*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017. **18**: p. 50-53.
2. AFSAPS, A.F.d.S.S.d.P.d.S., *PRESCRIPTION DES ANTIBIOTIQUES EN PRATIQUE BUCCO-DENTAIRE. RECOMMANDATIONS DE BONNE PRATIQUE*, 2011.
3. Ahariz, M., I. Loeb, and P. Courtois, *Candidoses orales et prothèses dentaires*. Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale, 2010. **111**(2): p. 74-78.
4. Aiyegoro, O.A. and A.I. Okoh, *Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy*. Journal of Medicinal Plants Research., 2009.
5. Al-Dwairi, Z.N., F.A. Al-Quran, and O.Y. Al-Omari, *The effect of antifungal agents on surface properties of poly(methyl methacrylate) and its relation to adherence of Candida albicans*. J Prosthodont Res, 2012. **56**(4): p. 272-80.
6. Al-Ma'ani, M.O., et al., *Effect of Miconazole Oral Gel in the Treatment of Denture- Induced Stomatitis*. Journal of the royal medical services, 2014.
7. Al-Sanabani1, N.F., et al., *Etiology and risk factors of stomatitis among yemeni denture wearers*. Universal Journal of Pharmaceutical Research, 2018.
8. Ali, B., et al., *Essential oils used in aromatherapy: A systemic review*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2015. **5**(8): p. 601-611.
9. Altarawneh, S., et al., *Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of Candida albicans, salivary flow, and dry mouth*. Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists, 2013. **22**(1): p. 13-22.
10. Amanlou, M., et al., *Miconazole gel compared with Zataria multiflora Boiss. gel in the treatment of denture stomatitis*. Phytother Res, 2006. **20**(11): p. 966-9.
11. Aoun, G. and A. Cassia, *Evaluation of Denture - Related Factors Predisposing to Denture Stomatitis in a Lebanese Population* Materia socio-medica, 2016. **28**(5): p. 392-396.
12. Aoun, G. and E. Gerges, *Assessment of Hygiene Habits in Acrylic Denture Wearers: a Cross-sectional Study*. Materia socio-medica, 2017. **29**(3): p. 216-218.
13. Araujo, D., M. Henriques, and S. Silva, *Portrait of Candida Species Biofilm Regulatory Network Genes*. Trends Microbiol, 2017. **25**(1): p. 62-75.
14. Arendrup, M.C., *Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology*. Dan Med J, 2013. **60**(11): p. B4698.
15. Asmaa Guernoug, N.e.h.G., *Elaboration d'une carte de répartition de deux espèces appartenant au genre Thymus et analyse de la composition chimiques des huiles essentielles extraites. Cas de Thymus Algeriensis Boiss. & Reut et de Thymus fontanesii Boiss. & Reut dans la région de Djendel -wilaya de Ain Defla*, in Département Sciences Agronomiques. 2017, Université Djilalai Bounaama -Khemis Meliana.
16. Avon, S.L., *Comparaison de deux techniques de prélèvement in vivo et étude de la dynamique du développement de la plaque prothétique chez des porteurs de prothèse sains et atteints de stomatite prothétique associée à Candida albicans*. 1999: Université Laval.
17. Ayoola, G., et al., *Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of Syzigium aromaticum (clove)*. African Journal of Microbiology Research, 2008. **2**(7): p. 162-166.
18. Bakhshi, M., et al., *Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis*. Gerodontology, 2012. **29**(2): p. e680-4.
19. Bakkali, F., et al., *Biological effects of essential oils – A review*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(2): p. 446-475.
20. Barbeau, J., et al., *Reassessing the presence of Candida albicans in denture-related stomatitis*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2003. **95**(1): p. 51-59.
21. Barros, S.P., et al., *Salivary cytokines and levels in denture stomatitis: An exploratory case-control study*. Open Journal of Stomatology, 2012.

22. Bekhechi, C., et al., *Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of Thymus fontanesii Boiss. et Reut. from Algeria*. Journal of Essential Oil Research, 2007. **19**(6): p. 594-596.
23. Bellet Virginie, M., *Mécanismes de résistance aux antifongiques*, in *Laboratoire de Parasitologie et mycologie médicale*, F. Pharmacie, Editor. 2017.
24. Ben Yahya, I., *Topiques*. EMC -Chirurgie orale et maxillo-faciale, 2013. **8**(3):1-15
25. Benaissa, F.Z., et al., *Stomatites Under Prosthetic. Epidemiological Study*. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, 2016.
26. Bhat, V., et al., *Screening of selected plant essential oils for their antifungal activity against candida species isolated from denture stomatitis patients*. Nitte University Journal of Health Science, 2014.
27. Bilhan, H., et al., *The role of Candida albicans hyphae and Lactobacillus in denture-related stomatitis*. Clin Oral Investig, 2009. **13**(4): p. 363-8.
28. Biotechnologie, S.d. *MISE AU POINT D'UN TEST DE QUANTIFICATION COLORIMETRIQUE DE CELLULES ET TEST DE CYTOTOXICITE*. 2017; Available from: www.biotech-away.fr/BTK-2.../BTK-2_2017-18_BioCell_TP04a_protocole_toxicite.pdf.
29. Bolender, C.L., R.D. Swenson, and G. Yamane, *Evaluation of treatment of inflammatory papillary hyperplasia of the palate*. Journal of Prosthetic Dentistry, 1965. **15**(6): p. 1013-1022.
30. Botelho, M.A., et al., *Antimicrobial activity of the essential oil from Lippia sidoides, carvacrol and thymol against oral pathogens*. Braz J Med Biol Res, 2007. **40**(3): p. 349-56.
31. Boubrit, S. and N. Boussad, *Détermination "in vitro " du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraiche type hachée.* , in *Ingéniorat d'état en biologie, option contrôle de la qualité et analyses*. 2007, Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou.
32. Boughendjouia, H., *Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de Citrus limon, Cinnamomum zeylanicum et Thymus numidicus.*, in *Biologie Vegetale*. 2015, UNIVERSITE BADJI-MOKHTAR - ANNABA.
33. Boussaid, M., *Caractérisation des huiles essentielles de Tetraclinis articulata (Vahl) Masters (Thuya de Barbarie) de la région de Tlemcen et étude de leurs activités biologiques*, in *THESE de Doctorat En Biologie - Université de TLEMEN*. 2017, THESE de Doctorat En Biologie - Université de TLEMEN.
34. Braga, P.C., et al., *Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of Candida albicans*. Fitoterapia, 2007. **78**(6): p. 396-400.
35. Bruneton, J., *Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants*. 1995: Lavoisier Publishing.
36. Brutel C. , I., *La population de la France métropolitaine en 2050 : un vieillissement inéluctable*. ÉCONOMIE ET STATISTIQUE, 2001.
37. Budtz-Jorgensen, E., et al., *Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility*. Community Dent Oral Epidemiol, 2000. **28**(2): p. 141-9.
38. Cahn, L., *The denture sore mouth*. Ann Dent 1936. **6**: p. 3:33.
39. Caillet, S. and M. Lacroix, *Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobienne et leurs applications potentielles en alimentaires.*, in *Laboratoire de Recherche en science appliquées a l'Alimentation (RESALA) . INRS- institut Armand-Frappier*. 2007, Université de Laval (Québec).
40. Calderone, R.A. and W.A. Fonzi, *Virulence factors of Candida albicans*. Trends Microbiol, 2001. **9**(7): p. 327-35.
41. Čanković, M., et al., *Prevalence and possible predictors of the occurrence of denture stomatitis in patients older than 60 years*. VOJNOSANITETSKI PREGLED, 2017: p. 311.
42. Cannon, R.D. and W.L. Chaffin, *Oral colonization by Candida albicans*. Crit Rev Oral Biol Med, 1999. **10**(3): p. 359-83.
43. Cao, Z., et al., *Rechargeable infection-responsive antifungal denture materials*. J Dent Res, 2010. **89**(12): p. 1517-21.
44. Carré, P., *Précis de technologie et de chimie industrielle*. Vol. T3. 1953.
45. Carvalhinho, S., et al., *Susceptibilities of Candida albicans mouth isolates to antifungal agents, essentials oils and mouth rinses*. Mycopathologia, 2012. **174**(1): p. 69-76.

46. Casalinuovo, I.A., P. Di Francesco, and E. Garaci, *Fluconazole resistance in Candida albicans: a review of mechanisms*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2004. **8**(2): p. 69-77.
47. Casaroto, A.R. and V.S. Lara, *Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis*. Fitoterapia, 2010. **81**(5): p. 323-8.
48. Catalan, A., et al., *In vitro and in vivo activity of Melaleuca alternifolia mixed with tissue conditioner on Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **105**(3): p. 327-32.
49. Chaieb, K., et al., *The chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzygium aromaticum L. Myrtaceae): a short review*. Phytother Res, 2007. **21**(6): p. 501-6.
50. Chami, F., et al., *Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004. **54**(5): p. 909-914.
51. Chami, N., et al., *Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo*. Oral Microbiol Immunol, 2005. **20**(2): p. 106-11.
52. Chandra, J., et al., *Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance*. J Bacteriol, 2001. **183**(18): p. 5385-94.
53. Chandra, J., et al., *Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic in vitro*. Journal of Dental Research, 2001. **80**(3): p. 903-908.
54. Chopde, N., et al., *Microbial colonization and their relation with potential cofactors in patients with denture stomatitis*. Journal of Contemporary Dental Practice, 2012. **13**(4): p. 456-459.
55. CLS, C.a.L.S., *M27-A3: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. **28**.
56. CLS, C.a.L.S., *M44-A2 Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. **second edition**.
57. Coco, B.J., et al., *Mixed Candida albicans and Candida glabrata populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis*. Oral Microbiology and Immunology, 2008. **23**(5): p. 377-383.
58. Coelho, C.M., Y.T. Sousa, and A.M. Dare, *Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry*. J Oral Rehabil, 2004. **31**(2): p. 135-9.
59. Coeriot, J.L., *Ecosystème de la cavité buccale*, U.d.R.C. Ardenne, Editor. 2010.
60. Conseil de l'Europe, *Pharmacopée Européenne 6° Ed. 2008 version Française (inclus 6.0-6.2)*. 6 ed. Vol. 1et 2. 2007.
61. Cortés-Rojas, D.F., C.R.F. de Souza, and W.P. Oliveira, *Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2014. **4**(2): p. 90-96.
62. Couderc, V., *Toxicité des huiles essentielles*, in *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT*. 2001.
63. Cox, S.D., et al., *The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil)*. Journal of Applied Microbiology, 2000. **88**(1): p. 170-175.
64. CUZIAT, J. *Cellule de Thoma*. [En ligne] 2011; Available from: <http://www.bioltrop.fr/spip.php?article361>.
65. da Costa, K.R., et al., *Candida albicans and Candida tropicalis in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity*. Mycopathologia, 2009. **167**(2): p. 73-9.
66. Darwazeh, A.M., S. Al-Refai, and S. Al-Mojaiwel, *Isolation of Candida species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers*. J Prosthet Dent, 2001. **86**(4): p. 420-3.
67. Demay, F., *Quelques notions fondamentales à propos des tests in vitro de cytotoxicité*, in *BTS BioAnalyses & Contrôles*. 2006, Université Victor Segalen (Bordeaux II).
68. Di Stasio, D., et al., *Management of denture stomatitis: a narrative review*. J Biol Regul Homeost Agents, 2018. **32**(2 Suppl. 1): p. 113-116.
69. Dob, T., et al., *Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thymus fontanesii*. Pharmaceutical Biology, 2006. **44**(8): p. 607-612.
70. Dorman, H.J. and S.G. Deans, *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. J Appl Microbiol, 2000. **88**(2): p. 308-16.

71. Dos Santos, C.M., et al., *Denture stomatitis and its risk indicators in south Brazilian older adults*. Gerodontology, 2010. **27**(2): p. 134-40.
72. Dotto, M., *L'Ouranite sous-prothétique: conceptions pathogéniques récentes : rôle du Candida albicans*. 1984: Médecine et hygiène.
73. El bouri, R., *Etude de L'effet fongitoxique de 37 extraits de plantes aromatiques et médicinales sur différentes espèces de Candida en milieu liquide.*, in *Thèse Université Mohammed V Rabat*. 2014.
74. Ellis, D., *Amphotericin B: spectrum and resistance*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49 Suppl 1**(0305-7453 (Print)): p. 7-10.
75. Emami, E., *Relation entre la commutation phénotypique de Candida albicans et la stomatite prothétique*, in *Département de dentisterie de restauration -Faculté de médecine dentaire*. 2005, Mémoire pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences biomédicales -Option réhabilitation prosthodontique- Université de Montréal.
76. Emami, E., M. Kabawat, and L.d.K. DDSb, *LA STOMATITE PROTHÉTIQUE: NOUVELLE PERSPECTIVE*. Journal de l'ordre des dentistes du Québec, 2013. **50**: p. 7-12.
77. Emami, E., et al., *Linking evidence to treatment for denture stomatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials*. J Dent, 2014. **42**(2): p. 99-106.
78. Emami, E., et al., *The relationship of myceliated colonies of Candida albicans with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study*. Int J Prosthodont, 2007. **20**(5): p. 514-20.
79. Emami, E., et al., *Favoring Trauma as an Etiological Factor in Denture Stomatitis*. Journal of Dental Research, 2008. **87**(5): p. 440-444.
80. Espinoza, I., et al., *Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile*. J Oral Pathol Med, 2003. **32**(10): p. 571-5.
81. Evren, B.A., et al., *The association between socioeconomic status, oral hygiene practice, denture stomatitis and oral status in elderly people living different residential homes*. Archives of Gerontology and Geriatrics, 2011. **53**(3): p. 252-257.
82. Fayad, M., et al., *Prevalence of Denture Stomatitis Among Complete Denture Wearers in Aljouf*. AL-AZHAR Dental Journal for Girls, 2018.
83. Felton, D., et al., *Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists*. Journal of Prosthodontics on Complete and Removable Dentures, 2011(1943-4723 (Electronic)).
84. Fernandez X., C.F., *La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation*. Vuibert, Paris,, 2012: p. 288.
85. Ferré, F., *Isolation et caractérisation des cellules souches gingivales : étude de leur potentiel multipotent*, in *Biologie Cellulaire*. 2013, UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES.
86. Figueiral, M.H., et al., *Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort*. J Oral Rehabil, 2007. **34**(6): p. 448-55.
87. Figueiral, M.H., et al., *Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral Candida albicans Susceptibility Profile and Genotypic Variability*. Open Dent J, 2015. **9**(1874-2106 (Electronic)): p. 46-51.
88. Fu, Y., et al., *Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination*. Phytother Res, 2007. **21**(10): p. 989-94.
89. Gade, J., P. Vinay singh, and S. Nikita, *Review on Denture Stomatitis Classification, clinical features and treatment*. Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS) 2015.
90. Gasparoto, T.H., et al., *Salivary immunity in elderly individuals presented with Candida-related denture stomatitis*. Gerodontology, 2012. **29**(2): p. e331-9.
91. Gasparoto, T.H., et al., *Isolation of Candida dubliniensis from denture wearers*. Journal of medical microbiology, 2009. **58**: p. 959-62.
92. Gauch, L.M.R., et al., *Isolation of Candida spp. from denture-related stomatitis in Pará, Brazil*. Brazilian Journal of Microbiology, 2018. **49**(1): p. 148-151.
93. Gaur, A., G. Kumar, and S. Siddiqui, *Study of Prevalence of Oral Lesions in Complete Denture Wearers*. Journal of International Oral Health, 2015.

94. Gebremedhin, S., et al., *Miconazole activity against Candida biofilms developed on acrylic discs*. J Physiol Pharmacol, 2014. **65**(4): p. 593-600.
95. Gendreau, L. and Z.G. Loewy, *Epidemiology and etiology of denture stomatitis*. J Prosthodont, 2011. **20**(4): p. 251-60.
96. Ghannadi, A., et al., *Thymus fontanesii Boiss. & Reut.--A potential source of thymol-rich essential oil in North Africa*. A Journal of Chemical Sciences, 2004(0939-5075 (Print)).
97. Giordani, R. and J. Kaloustian, *Action anticandidosique des huiles essentielles : Leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques*. Phytothérapie, 2006. **4**(3): p. 121-124.
98. Guan, W., et al., *Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods*. Food Chemistry, 2007. **101**(4): p. 1558-1564.
99. Gucwa, K.A.-O., et al., *Investigation of the Antifungal Activity and Mode of Action of Thymus vulgaris, Citrus limonum, Pelargonium graveolens, Cinnamomum cassia, Ocimum basilicum, and Eugenia caryophyllus Essential Oils*. Molecules, 2018(1420-3049 (Electronic)).
100. Haddouchi, F., et al., *Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de Thymus fontanesii Boiss & Reut*. Afrique SCIENCE, 2009: p. 246 - 259
101. Hammer, K.A., C.F. Carson, and T.V. Riley, *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. J Appl Microbiol, 1999. **86**(6): p. 985-90.
102. Hartmann, D., *Biomatériaux (Dispositifs médicaux) Biocompatibilité et Ingénierie tissulaire*, in *ISPB/UMR CNRS 5510 « MATEIS »*. 2016, Université C. Bernard-Lyon.
103. Hasan, S. and d.k. Singh, *Denture Stomatitis: A Literature Review*. Journal of Orofacial & Health Sciences, 2015. **6**: p. 65.
104. Hilgert, J.B., et al., *Interventions for the Management of Denture Stomatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Journal of the American Geriatrics Society, 2016. **64**(12): p. 2539-2545.
105. Hoshing, C.D., Santosh; Mootha, Ajay; Diwan, Nikhil. , *Role of Candida albicans in Denture Stomatitis*. Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology 2011. **Vol. 23, N° 4**: p. 617-619.
106. Hu, Z., J. Zhang, and X. Cheng, *Antifungal efficiency of miconazole and econazole and the interaction with transport protein: a comparative study*. Pharm Biol, 2015. **53**(2): p. 251-61.
107. HÜE, O. and M.-V. BERTERETCHE, *Prothèse complète : réalité clinique solutions thérapeutiques*. 2004.
108. Hugh, D., *Complete Dentures : A Clinical Manual of General Dental Practitioner* Springer ed. 2001.
109. INRAA, *Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie*. <http://www.inraa.dz/>.
110. Işeri, U., A. Uludamar, and Y.K. Ozkan, *Effectiveness of different cleaning agents on the adherence of Candida albicans to acrylic denture base resin*. Gerodontology, 2011. **28**(4): p. 271-276.
111. ISO, I.O.S., ed. *Normes AFNOR :Evaluation biologique des dispositifs médicaux ISO 10993 - Partie 5 : essais concernant la cytotoxicité in vitro*. 2010.
112. Jankittivong, A., V. Aneksuk, and R.P. Langlais, *Oral mucosal lesions in denture wearers*. Gerodontology, 2010. **27**(1): p. 26-32.
113. Jirovetz, L., et al., *Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(17): p. 6303-7.
114. Kabawat, M., et al., *Phase-I clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis*. The International Journal of Prosthodontics, 2014.
115. Kalembe, D. and A. Kunicka, *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*. Curr Med Chem, 2003. **10**(10): p. 813-29.
116. Kamikawa, Y., et al., *Clinical study on anti-fungal drug activity against clinically isolated strains of oral Candida species*. Oral Science International, 2013. **10**(2): p. 87-94.
117. Karthikeyan, S., T. Fernandez, and P. Deepthi, *Denture Stomatitis: A Brief Review*. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, 2016.
118. Khan, M.A., S. Dhaded, and S. Joshi, *Commercial and Plant Extract Denture Cleansers in Prevention of Candida albicans Growth on Soft Denture Reliner: In Vitro Study*. J Clin Diagn Res, 2016. **10**(2): p. ZC42-5.

119. Khare, P., et al., *Assessment of denture stomatitis in removable denture wearers and its correlation with variable factors such as age, gender, length of denture use and nocturnal dental care*. Indian Journal of Anatomy and Surgery of Head, 2017.
120. Kossioni, A.E., *The prevalence of denture stomatitis and its predisposing conditions in an older Greek population*. Gerodontology, 2011. **28**(2): p. 85-90.
121. Kouidhi, B., T. Zmantar, and A. Bakhrouf, *Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (Eugenia caryophyllata) against a large number of oral pathogens*. Annals of Microbiology, 2010. **60**(4): p. 599-604.
122. Kulak-Ozkan, Y., E. Kazazoglu, and A. Arikan, *Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people*. J Oral Rehabil, 2002. **29**(3): p. 300-304.
123. Labib, G.S. and H. Aldawsari, *Innovation of natural essential oil-loaded Orabase for local treatment of oral candidiasis*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**(1177-8881 (Electronic)): p. 3349-59.
124. Lacoste-Ferré, M.-H., et al., *L'écosystème buccal chez le patient âgé*. Gériatrie et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement, 2013. **11**(2): p. 144-50.
125. Lagane, C., *Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR-gamma dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de Candida Albicans : implication de PPAR-gamma in U.F.R. des Sciences de la Vie et de la Santé*. 2007 UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER
126. Lahlou, M., *Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils*. Phytother Res, 2004. **18**(6): p. 435-48.
127. Lambson Go Fau - Anderson, R.R. and R.R. Anderson, *Palatal papillary hyperplasia*. J Prosthet Dent, 1967(0022-3913 (Print)).
128. Lee, M.H. and H.-J. Kim, *Antimicrobial Activity, Cytotoxicity and Bioactive Constituents by GC/MS, Analysis of Essential Oils*. International Journal of Pure and Applied Mathematics, 2018. **Volume 120, No. 6, 5139-5159**.
129. Li, X., J. Yan Z Fau - Xu, and J. Xu, *Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of Candida albicans*. Microbiologie, 2003(1350-0872 (Print)).
130. Liu, X., et al., *Screening of Food Additives and Plant Extracts against Candida Albicans in Vitro for Prevention of Denture Stomatitis*. Procedia Environmental Sciences, 2012. **12**: p. 1361-1366.
131. Loster, B.W., et al., *Mycological analysis of the oral cavity of patients using acrylic removable dentures*. Gastroenterology Research and Practice, 2012(1687-630X (Electronic)).
132. Loster, J.E., A. Wiczorek, and B.W. Loster, *Correlation between age and gender in Candida species infections of complete denture wearers: a retrospective analysis*. Clinical Interventions in Aging, 2016(1178-1998 (Electronic)): p. 1707.
133. Maarif, K., *Extraction, activite et approches galeniques de cinq huiles essentielles antifongiques*. Thèse Universite Mhammed V RABAT 2008.
134. Mallié, M., *Surveillance des traitements antifongiques: les antifongigrammes et les dosages d'antifongiques sont-ils utiles?* 11^{ème} Journées Nationale d'Infectiologie, 2010.
135. Mandali, G., et al., *Factors affecting the distribution and prevalence of oral mucosal lesions in complete denture wearers*. Gerodontology, 2011. **28**(2): p. 97-103.
136. Manohar, V., et al., *Antifungal activities of origanum oil against Candida albicans*. Mol Cell Biochem, 2001. **228**(1-2): p. 111-7.
137. Mansourian, A., et al., *The comparative study of antifungal activity of Syzygium aromaticum, Punica granatum and nystatin on Candida albicans; an in vitro study*. J Mycol Med, 2014. **24**(4): p. e163-8.
138. Marchese, A., et al., *Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint*. Crit Rev Microbiol, 2017. **43**(6): p. 668-689.
139. Marchini, L., et al., *Self-reported oral hygiene habits among institutionalised elderly and their relationship to the condition of oral tissues in Taubate, Brazil*. Gerodontology, 2006(0734-0664 (Print)).
140. Marcos-Arias, C., et al., *In vitro activities of natural products against oral Candida isolates from denture wearers*. BMC Complement Altern Med, 2011. **11**(1): p. 119.

141. Maret, D., et al., *Prélèvements buccaux en pratique clinique*. EMC - Odontologie, 2012.
142. Marinoski, J., M. Bokor-Bratic M Fau - Cankovic, and M. Cankovic, *Is denture stomatitis always related with candida infection? A case control study*. Med Glas Zenica, 2014(1840-2445 (Electronic)).
143. Marinoski, J., M. Bokor-Bratić, and M. Čanković, *Is denture stomatitis always related with candida infection? A case control study*. Medicinski Glasnik, 2014.
144. Martori, E., et al., *Risk factors for denture-related oral mucosal lesions in a geriatric population*. J Prosthet Dent, 2014. **111**(4): p. 273-9.
145. MARY, H., *Etude de la formation de nodules cellulaires par des cellules souches sur support de Phosphate de Calcium-Chitosan-Acide hyaluronique*, in *Laboratoire BIOS- Master 1*. 2017, Mémoire de stage de Master 1 - Université de Remis -Champagne Ardenne.
146. Mathew, A.L., et al., *The prevalence of oral mucosal lesions in patients visiting a dental school in Southern India*. Indian J Dent Res, 2008. **19**(2): p. 99-103.
147. Mayer, F.L., D. Wilson, and B. Hube, *Candida albicans pathogenicity mechanisms*. Virulence, 2013. **4**(2): p. 119-128.
148. McCullough, M.J. and N.W. Savage, *Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry*. Austr Dental Journal, 2005(0045-0421 (Print)).
149. Mebarki, N., *Extraction de l'huile essentielle de Thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse anti microbienne*, in *Génie des Procédés Chimiques et Pharmaceutiques*. 2010, Université M'hamed Bougara Boumerdes.
150. Mechakra, H., *Influence du mode de polymérisation de la protéhse en résine acrylique sur le pH salivaire chez l'edenté total*, in *Département de Médecine Dentaire*. 2019, Thèse de Doctorat en Sciences Médicale. Université Baji Mokhtar - Annaba.
151. Mendes, A., et al., *Candida albicans biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells*. Biol Pharm Bull., 2007(0918-6158 (Print)).
152. Merdes, L., *DYNAMIQUE DE COLONISATION MICROBIENNE DES PROTHESES ADJOINTES COMPLETES :étude comparative de deux protocoles d'hygiène chez des sujets édentés complets appareillés*, in *Département de Chirurgie Dentaire - Faculté de ANNABA*. 2009, Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Université BADJI MOKHTAR ANNABA. p. 255.
153. Merdes, L., et al., *Preferred sites of accumulation of microbial plaque as shown by the color of the exterior surface of complete dentures*. Odonto-stomatologie tropicale, 2009(0251-172X (Print)).
154. Merot, C., *L'edenté total et son alimentation*, in *Unité de foramtion et de recherche d'Odontologie* 2010, Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire - Université de Nante.
155. Milica, J. and O. Radmila, *THE ROLE OF CANDIDA-ALBICANS ON THE DEVELOPMENT OF STOMATITIS IN PATIENTS WEARING DENTURES*. SANAMED, 2018.
156. Mouhi, L., et al., *Anti-inflammatory activity of essential oil of an endemic Thymus fontanesii Boiss. & Reut. with chemotype carvacrol, and its healing capacity on gastric lesions*. Journal of Food Biochemistry, 2017. **41**(3): p. e12359.
157. Nabet, N., et al., *Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Thymus fontanesii Boiss. et Reut. and Origanum glandulosum Desf. essential oils*. Vol. 24. 2017. 2518-2525.
158. Nagara, S., R.G. Desai, and A.K. Patil, *Isolation of Candida species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers*. The journal of contemporary dental practice, 2014.
159. Naik, A.V. and R.C. Pai, *A study of factors contributing to denture stomatitis in a north Indian community*. Int J Dent, 2011. **2011**: p. 589064.
160. Namala, B.B. and V. Hegde, *Comparative evaluation of the effect of plant extract, Thymus vulgaris and commercially available denture cleanser on the flexural strength and surface roughness of denture base resin*. J Indian Prosthodont Soc, 2019. **19**(3): p. 261-265.
161. Navabi, N., et al., *Risk factors associated with denture stomatitis in healthy subjects attending a dental school in southeast iran*. Sultan Qaboos University medical journal, 2013. **13**(4): p. 574-580.
162. Nazzaro, F., et al., *Essential Oils and Antifungal Activity*. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 2017. **10**(4): p. 86.

163. NCCLS, N.C.f.C.L.S.o.A.S.T., *Performance standats for Antimucribial Susceptibilité Testing*. Eleventh Information Supplement. NCCLS document M100-S11, Pensylvanie. USA., 2001.
164. Nikawa, H., et al., *Candida adherence and biofilm formation on oral surfaces*. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi, 2005. **46**(4): p. 233-42.
165. Nostro, A. and T. Papalia, *Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives*. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2012. **7**(1): p. 28-35.
166. Numération-Cellulaire. *Comptage cellulaire sur la cellule de Thoma*. Available from: www.celeromics.com.
167. Odds, F.C., *Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003(0305-7453 (Print)).
168. Øilo, M. and V. Bakken, *Biofilm and Dental Biomaterials*. materials, 2015.
169. Omran, S.M., S. Esmailzadeh, and Z. Rahmani, *Laboratory study of anticandidal activity of thyme, pennyroyal and lemon essential oils by micro dilution method*. Jundishapur Journal of Microbiology, 2010.
170. Oumami, N., *Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes aromatiques et médicinales du Maroc : Origanum elongatum et Origanum majorana*, in *Chimie-Biologie-Santé*. 2012, Thèse de Doctorat - Université Hassan II Mohammedia - Casablanca.
171. Oussadit, Z., *Lesions traumatiques chroniques de la muqueuse buccale engendrées par le port des prothèses amovibles totales .Etude clinique et épidémiologique.*, in *Département de Médecine Dentaire*. 2009, Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen: Thèse de Doctorat en Sciences Médicales
172. Patil, S., B. Doni, and S. Maheshwari, *Prevalence and distribution of oral mucosal lesions in a geriatric Indian population*. Canadian geriatrics journal : CGJ, 2015. **18**(1): p. 11-14.
173. Patil, S., et al., *Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 1391.
174. Pereira-Cenci, T., et al., *Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights*. Journal of Applied Oral Science, 2008. **16**: p. 86-94.
175. Pereira, C.A., et al., *Production of virulence factors in Candida strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016. **85**(1): p. 66-72.
176. Petersen, P.E. and T. Yamamoto, *Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme*. Community Dent Oral Epidemiol, 2005. **33**(2): p. 81-92.
177. Petrović, M., et al., *Therapeutic alternatives of natural compounds in treatment of Candida-associated denture stomatitis*. Acta medica Medianae,, 2014. **vol. 53, br. 1, str. 73-79**
178. Pinelli, L.A., et al., *Ricinus communis treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly*. J Oral Rehabil, 2013. **40**(5): p. 375-80.
179. Pinto, E., et al., *Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida, Aspergillus and dermatophyte species*. J Med Microbiol, 2009. **58**(Pt 11): p. 1454-62.
180. Pires, F.R., et al., *Denture stomatitis and salivary Candida in Brazilian edentulous patients*. J Oral Rehabil, 2002. **29**(11): p. 1115-9.
181. Puryer, J., *Denture Stomatitis - A Clinical Update*. Dent Update, 2016. **43**(6): p. 529-30, 533-5.
182. Puškárová, A., et al., *The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 8211-8211.
183. Quntallet, O., *Prise en charge d'un patient édenté présentant des pathologies locales et générales: thérapeutiques prothétiques.*, in *Unité de formation et e recherche en odontologie*. 2013, THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE- UNIVERSITE DE NANTES.
184. Rabiei, M., et al., *Prevalence of oral and dental disorders in institutionalised elderly people in Rasht, Iran*. Gerodontology, 2010. **27**(3): p. 174-177.
185. Ramage, G., et al., *Inhibition of Candida albicans biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule*. Applied and environmental microbiology, 2002. **68**(11): p. 5459-5463.
186. Ramage, G., et al., *Denture stomatitis: a role for Candida biofilms*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. **98**(1): p. 53-9.

187. Razafimamonjison, G., et al., *Effects of phenological stages on yield and composition of essential oil of Syzygium aromaticum buds from Madagascar*. International Journal of Basic and Applied Sciences,, 2013. **2**.
188. Razafimamonjison, G., et al., *Bud, leaf and stem essential oil composition of Syzygium aromaticum from Madagascar, Indonesia and Zanzibar*. International Journal of Basic and Applied Sciences, 2014. **3**(3): p. 10.
189. Revol, P., et al., *Stomatologie gériatrique*. Médecine buccale, 2008.
190. Ridacom, S. *HiCrome™ Candida Differential Agar Base*. Available from: <https://ridacom.com/en/products/view/5016>.
191. Rivera, C., D. Droguett, and M.-J. Arenas-Márquez, *Oral mucosal lesions in a Chilean elderly population: A retrospective study with a systematic review from thirteen countries*. Journal of clinical and experimental dentistry, 2017. **9**(2): p. e276-e283.
192. Rowe, R.C. and P.J. Sheskey, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Sixth Edition ed. 2009.
193. Saadat, M., *Candida species and inflammation mediators in denture stomatitis: detection in biological samples*. 2017, Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences . Université de Montréal.
194. Salerno, C., et al., *Candida-associated denture stomatitis*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2011. **16**(2): p. e139-43.
195. Samaranayake, L. and T.W. MacFarlane, *Classification of oral candidosis*. Oral Candidosis, 1990: p. 124-132.
196. Sant'Ana, P.d.L., et al., *Multicenter Brazilian Study of Oral Candida Species Isolated from Aids Patients*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002. **97**: p. 253-257.
197. Sardi, J.C., et al., *Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options*. J Med Microbiol, 2013. **62**(Pt 1): p. 10-24.
198. Savignac, K., *Stomatite prothétique, candidose orale et leur évolution dans le temps*, in *Département de dentisterie de restauration 2011*, Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en médecine dentaire -Université de Montréal
199. Scorzoni, L., et al., *Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds*. Journal of microbiological methods, 2016. **123**: p. 68-78.
200. Scorzoni, L., et al., *Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis*. Front Microbiol, 2017. **8**(1664-302X (Print)): p. 36.
201. Scully, C., *Denture-related stomatitis*, in *Oral and Maxillofacial Medicine (Third Edition)*. 2013, Churchill Livingstone. p. 264-267.
202. Sebaa, S., *Inhibition des biofilms à Candida albicans : recherche de nouvelles approches thérapeutiques*, in *Thèse*. 2017.
203. Serra, E., et al., *Antifungal Activity of Commercial Essential Oils and Biocides against Candida Albicans*. LID - E15 [pii] LID - 10.3390/pathogens7010015 [doi]. Pathogens, 2018(2076-0817 (Print)).
204. Shah, A.A. and T.J. Ahmad, *Oral mucosal lesions in complete denture wearers*. Journal of Pakistan Association of Dermatologists 2011.
205. Shulman, J.D., F. Rivera-Hidalgo, and M.M. Beach, *Risk factors associated with denture stomatitis in the United States*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2005. **34**(6): p. 340-346.
206. Sidali, L., et al., *Chemical composition, acute toxicity, antimicrobial and anti-inflammatory activities of Thymus fontanesii essential oil from Algeria* PhytoChem & BioSub Journal 2017. **11**(1).
207. Sivaramakrishnan, G. and K. Sridharan, *Alternatives to antifungal therapy for denture stomatitis: A systematic review and meta-analysis*. Saudi Journal of Oral Sciences, 2017.
208. Skupien, J.A., et al., *Prevention and treatment of Candida colonization on denture liners: a systematic review*. J Prosthet Dent, 2013. **110**(5): p. 356-62.
209. Soulet, M., *Les pathologies buccales : conseils et alternatives en aromathérapie. Enquête au sein des officines du Poitou Charentes.*, in *Faculté de Médecine et de Pharmacie 2017*, THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE- Université de POITIERS.

210. Srivastava, A.K., S.K. Srivastava, and K.V. Syamsundar, *Bud and leaf essential oil composition of Syzygium aromaticum from India and Madagascar*. Flavour and Fragrance Journal, 2005. **20**(1): p. 51-53.
211. Staniszewska, M., et al., [*Virulence factors of Candida albicans*]. PRZEGL EPIDEMIOLOG, 2012(0033-2100 (Print)).
212. Tabti, S., *Capacité de formation d'un biofilm par des souches bactériennes isolées de plaque ODF chez les enfants*, in *Biologie Moléculaire et Cellulaire*. 2014, Thèse - UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM.
213. Tangarife-Castaño, V., et al., *Anti-Candida albicans activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants*. Infectio, 2011. **15**(3): p. 160-167.
214. Teixeira, B., et al., *Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils*. Industrial Crops and Products, 2013. **43**: p. 587-595.
215. Turina, A.V., et al., *Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning*. Biophys Chem, 2006. **122**(2): p. 101-113.
216. Vanden Abbeele, A., et al., *Denture contamination by yeasts in the elderly*. Gerodontology, 2008. **25**(4): p. 222-8.
217. Vinod KG, A.R., Vikas KN, Kalishankar M, , *Antimicrobial activity of Spondias pinnata resin*. Journal of Medicinal Plants Research. , 2010. **4**(16): p. 1656-1661.
218. Von Fraunhofer, J.A. and Z.G. Loewy, *Factors involved in microbial colonization of oral prostheses*. Gen Dent, 2009. **57**(2): p. 136-43; quiz 144-5.
219. Webb, B.C., C.J. Thomas, and T. Whittle, *A 2-year study of Candida-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects*. Gerodontology, 2005. **22**(3): p. 168-76.
220. Webb, B.C., et al., *Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity*. Aust Dent J, 1998. **43**(1): p. 45-50.
221. Weindl, G., et al., *Mucosal Immunology in Candida albicans Infection*, in *Human Fungal Pathogens*, O. Kurzai, Editor. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 161-176.
222. Worldbank. *Banque Mondiale : IBRD-IDA*. 2019; Available from: <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.LE00.IN>.
223. Xie, Q., G. Ding T Fau - Yang, and G. Yang, *Rehabilitation of oral function with removable dentures--still an option?* J Oral Rehabil, 2015(1365-2842 (Electronic)).
224. Zacchino, S.A., et al., *Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs*. Phytomedicine, 2017(1618-095X (Electronic)).
225. ZAIKA, L.L., *SPICES AND HERBS: THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND ITS DETERMINATION1*. Journal of Food Safety, 1988. **9**(2): p. 97-118.
226. Zissis, A., S. Yannikakis, and A. Harrison, *Comparison of denture stomatitis prevalence in 2 population groups*. Int J Prosthodont, 2006. **19**(6): p. 621-5.
227. Zomorodian, K., et al., *Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers*. Medical Mycology, 2011. **49**(2): p. 208-211.
228. Zwiri, A.M.A., *The Prevalence And Associated Factors Of Denture Wearing Associated Oral Lesions Among Dental Patients Attending College Of Dentistry Clinics In Aljouf University*. European Scientific Journal, 2016. **12**(9): p. 326-332.

Annexes

Formulaire de Consentement Eclairé

1. Thème de l'étude :

« Etude comparative de l'activité anti fongique de l'association Carvacrol /Eugénol et le Miconazole contre la stomatite sous prothétique chez l'édenté total appareillé »

Investigateurs :

Dr. Imane AZZOUNI

Maitre assistante hospitalo-universitaire - Service de Prothèse Dentaire CHU Tlemcen

Pr. Nouredine SENOUCI

Directeur de Thèse - Service de Prothèse Dentaire CHU Oran

Pr. Djamila Bouziane

Co- directrice de Thèse – Service de Parodontologie CHU Oran

2. Objectif de l'étude épidémiologique :

Ce projet a pour but l'identification de l'agent microbien responsable de la lésion stomatite prothétique obtenu à partir des prélèvements des prothèses dentaires de patients appareillés.

3. Les procédures auxquelles vous serez soumis pour cette étude :

- Lors de votre consultation, vous devenez participant de l'étude si vous présentez les critères d'inclusion.
- Votre participation est absolument volontaire.
- Vous aurez à répondre à un bref questionnaire afin de recueillir des informations sur votre état de santé, la prise de médicaments et le soin que vous prenez de votre prothèse dentaire.
- La procédure de l'étude fait appel à :
 - ✓ Un examen clinique
 - ✓ Un prélèvement mycologique des prothèses dentaires
 - ✓ Des enregistrements photographiques du palais et des prothèses dentaires.
- A la fin de votre participation, nous procéderons à la réparation ou au renouvellement de vos prothèses.

4. Engagement des participants :

- Votre participation à ce projet sera connue seulement de la personne chargée de faire la collecte des données.
- Celles-ci seront saisies sur un formulaire en utilisant un code d'identification.
- Lors de la publication des résultats, aucune information ne permettra d'identifier les participants.
- Vous n'encourez aucun risque, puisque seul un prélèvement sera effectué et des prises de photographies de la lésion.
- Vous ne retirerez aucun bénéfice financier en participant à cette étude, mais les retombées sur l'avancement des connaissances pourront profiter à vous et aux autres patients souffrant de cette lésion dans le futur.

Consentement Éclairé Du Patient

Je déclare avoir lu et compris ce qu'on exige des participants, et c'est en toute liberté que j'accepte d'agir comme sujet pour ce projet de recherche.

Une réponse satisfaisante a été donnée à toutes mes questions.

Je demeure libre de retirer mon consentement à tout moment, avant ou pendant le déroulement de la procédure et ce, sans m'exposer à subir de préjudice.

Je certifie avoir accepté de me porter volontaire, et avoir signé ce formulaire en toute liberté, sans aucune pression.

Signature du patient (e) :

Signature du clinicien chercheur :

Témoin :

Date :

نموذج الموافقة المستنيرة

1. موضوع المشروع :

التهاب دراسة مقارنة للنشاط المضاد للفطريات لمزيج **Carvacrol / Eugénol** وميكونازول في المرضى الذين يعانون من الفم الاصطناعي

2. المحقق

د. إيمان عزوني

مستشفى الجامعة استاذ مساعد

مستشفى الخدمات الاستشارية لطب الأسنان تلمسان

3. الغرض من الدراسة الوبائية

الغرض من هذا المشروع هو تحديد العامل الجرثومي المسؤول عن آفة التهاب الفم الاصطناعية التي تم الحصول عليها من العينات الاصطناعية للمرضى المقترنين

4. الإجراءات التي ستخضع لها في هذه الدراسة

. عندما تتشاور ، تصبح مشاركًا في الدراسة إذا قدمت معايير الاشتمال -

. المشاركة طوعية على الإطلاق-

سيجب عليك الإجابة على استبيان موجز لجمع معلومات عن حالتك الصحية ، وتناول الأدوية والعناية التي تأخذها من طرف -
الأسنان

:إجراءات الدراسة تستدعي -

فحص سريري

أخذ عينات من فطريات الأسنان الاصطناعية

.تسجيلات صوتية للحنك وأطقم الأسنان

.في نهاية مشاركتك ، سنقوم بإصلاح أو تجديد الأطراف الصناعية الخاصة بك -

5. التزام المشتركين

.سيتم إدخالها في نموذج باستخدام رمز تعريف.لن تُعرف مشاركتك في هذا المشروع إلا للشخص المسؤول عن جمع البيانات -

.حيث يتم نشر النتائج ، لن تحدد أي معلومات المشاركين-

.أنت لا تتحمل أي خطر ، حيث سيتم أخذ عينة فقط والصور من الآفة

لن تحصل على أي منفعة مالية من المشاركة في هذه الدراسة ، لكن تأثير ذلك على تقدم المعرفة سيفيدك أنت والمرضى الآخرين -

.الذين يعانون من هذه الإصابة في المستقبل

موافقة المريض المستنيرة

أقر بأنني قد قرأت وفهمت ما هو مطلوب من المشاركين، وبصيح كامل أوافق على التصرف كموضوع لهذا المشروع البحثي

لقد أعطيت إجابة مرضية لجميع أسئلتني

أظل مطلق الحرية في سحب موافقتي في أي وقت، قبل أو أثناء سير الدعوى، دون تعريض نفسي للتحيز

أقر بأنني قبلت التطوع، ووقعت على هذا النموذج بحرية، دون أي ضغوط

توقيع المريض:

التاريخ:

توقيع الباحث السريري:

Annexe 2 : Questionnaire d'évaluation d'une enquête pré-prothétique

N° du patient :

Date :

A. Données Anamnestiques :

1. Etat civil :

Nom : Prénom :

Sexe : Homme Femme

Age :

Tranche d'Age : [40-50[[50-60[[60-70[[70-80[

Adresse :_ Téléphone :

2. Motif de consultation :

Douloureuse Instable Ancienne Fracturée / Réparée

3. Antécédents prothétiques :

- Ancienneté de la prothèse : ≤ 10 ans 10-20 20-30 ≥ 30 ans

B. Données sur les habitudes de l'entretien bucco -prothétique :

4. Méthodes de nettoyage :

Rinçage de la
prothèse à l'eau

Brossage de la
prothèse à l'eau

Brossage de la prothèse
avec détergent
(Savon ou dentifrice)

Trempage de la prothèse
dans un désinfectant
(Eau javel, comprimés)

5. Fréquence d'entretien de la prothèse :

Rarement (tous les mois)

Souvent (chaque semaine)

Régulièrement (chaque jours)

6. Port nocturne de la prothèse :

OUI

Parfois

NON

7. Conservation de la prothèse maxillaire :

Au sec

Humide

Dans un désinfectant (eau de javel, désinfectant)

8. Brossage du palais :

OUI

NON

C. Données cliniques :

9. Grade de la stomatite : classification de Newton modifiée

Type I : Pétéchies dispersées sur un ou plusieurs quadrants du palais

Type II : Erythème diffus

Type III : Hyperémie diffuse avec hyperplasie

Grade A : 1 à 2 quadrants du palais

Grade B : 3 à 4 quadrants du palais

10. Caractéristiques de la stomatite prothétique : (possibilité de plusieurs réponses)

Douleur/ Brulure

Erythème

Granulation

Saignement

11. Indication du traitement prothétique :

Prothèse non renouvelée

Prothèse rebasée

Prothèse renouvelée

Annexe 3 : Fiche de Diagnostic Mycologique

Fiche de Diagnostic Mycologique

Le thème : « Etude comparative de l'activité anti fongique de l'association Carvacrol / Eugénol avec le Miconazole contre la stomatite prothétique »

1. Référence de l'écouvillon /Numéro du patient :

2. Date du prélèvement :

3. Nom et prénom du patient :

4. Grade de la lésion :

Type I :	<input type="checkbox"/>	grade A	<input type="checkbox"/>	grade B	<input type="checkbox"/>
Type II :	<input type="checkbox"/>	grade A	<input type="checkbox"/>	grade B	<input type="checkbox"/>
Type III :	<input type="checkbox"/>	grade A	<input type="checkbox"/>	grade B	<input type="checkbox"/>

5. Examen mycologique :

Examen directe :

positif

négatif

(Présence de pseudo-filament, ou de filament)

Culture sur milieu Chromogène :

positive

négative

(Présence de colonies ≥ 10)

Identification :

Mono-espèce

Pluri-espèces

Candida albicans

Candida glabrata

Candida tropicalis

Candida dubliniensis

Canida Kruesi

Candida paraplois

Annexe 4 : Composition et préparation des milieux de culture

A. Milieu de culture chromogène pour levures Hichrom® : Candida Differential Agar, HIMEDIA™ M1297A, India

Présentation : poudre déshydratée.

Composition:

_Péptone.....	1g
Extrait de levure	4g
Phosphate d'hydrogène dipotassium ..	1g
Mélange chromogène	7g
Chloramphénicol.....	0,5g
Agar.....	15g
pH (à 25°C)	6,3 ± 0,2

Préparation

42,72 g du milieu est dilué dans 1L d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition sans autoclavage.

Ensuite le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri à une température de 45-50°C.

Ce milieu permet un isolement et une identification présomptive des levures.

B. Milieu de culture pour levures Sabouraud / Chloramphénicol : Gélose MEDIA™ Certified ISO 9001 : 2008

Présentation : poudre déshydratée

Composition :

Dextrose.....	10 g /L
Agar	5g/L
Peptone	10 g/L
Chloramphénicol	0,05mg/L
pH	5,6 ± 0,2 à 25°C

Préparation du milieu :

42,5 g de milieu déshydraté est dilué dans un litre d'eau distillée stérile jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Le mélange est chauffé lentement en agitant fréquemment, puis est porté à ébullition jusqu'à dissolution complète.

Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes, puis réparti en tubes ou en boîtes de Petri.

C. Bouillon de culture pour levures Sabouraud :Diagnostic Liofilchem® ITALY

Présentation: Milieu déshydraté

Composition : Caséine5 g/L
 Peptique des tissus animaux... 5 g/L
 Dextrose.....20 g/L
 pH final 5,6 ± 0,2 à 25°C

Préparation: 30 g de poudre est mélangé à un litre d'eau distillée. Le mélange est chauffé jusqu'à ébullition pour obtenir une dissolution complète. Le contenu est distribué dans des récipients appropriés et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.



Figure n° 92 : Milieux de culture utilisés dans notre l'étude,

(A) : Milieu chromogène HiCrome HIMEDIA™, Laboratoire de Mycologie Médicale CHU Tlemcen.

(A) : Milieu Sabouraud chloramphenicol™ MEDIA® , Laboratoire de Mycologie Médicale CHU Tlemcen.

(B) : Bouillon Sabouraud, Diagnostic Liofilchem® , Laboratoire BIOS, Université de Reims.

(D): Milieu pour la culture cellulaire des fibroblastes gingivaux. Laboratoire BIOS, Université de Reims.

D. Milieu pour culture cellulaire :

Composition du milieu :

DMEM :Dulbecco's Modified Eagle Medium(GIBCO®)Low glucose Glutamax.....1g /L
 Sérum de Veau Foetal (SVF)10%
 Pénicilline.....1% (100µg /mL)
 Streptomycine1%
 Amphotéricine B5 µg/mL
 Acide ascorbique-2 phosphate50 µg/mL

Annexe 5 : Tableau d'interprétation des résultats du test Auxacolor 2

10000 -f+ 05	<i>Candida krusei</i>	71325 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
10000 -25	<i>Geotrichum capitatum</i>	71334 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
10000 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71335 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
10000 +f+ 05	<i>Candida lipolytica</i>	71400 -04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
10000 +05	<i>Candida nonvegensis</i>	71402 +07	<i>Candida dubliniensis</i>
10000 +04	<i>Candida inconspicua</i>	71410 +07	<i>Candida dubliniensis</i>
10010 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71411 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
10010 +f+ 05	<i>Candida lipolytica</i>	71412 +07	<i>Candida dubliniensis</i>
10040 -f+ 21	<i>Geotrichum candidum</i>	71420 -04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
10200 -00	<i>Kloeckera apiculata</i>	71421 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
10200 +05	<i>Candida nonvegensis</i>	71422 +01	<i>Candida sake</i>
10200 +f+ 05	<i>Candida lipolytica</i>	71430 +07	<i>Candida dubliniensis</i>
10240 +05	<i>Candida nonvegensis</i>	71431 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
10400 -04	<i>Candida glabrata</i>	71432 +01	<i>Candida sake</i>
10400 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71432 +07	<i>Candida dubliniensis</i>
10402 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71440 +07	<i>Candida albicans 1</i>
10410 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71441 +07	<i>Candida albicans 1</i>
10400 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71442 +07	<i>Candida albicans 1</i>
10610 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71443 +07	<i>Candida albicans 1</i>
11000 -25	<i>Geotrichum capitatum</i>	71450 +07	<i>Candida albicans 1</i>
11000 +f+ 05	<i>Candida lipolytica</i>	71451 +07	<i>Candida albicans 1</i>
11000 +05	<i>Candida rugosa</i>	71451 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
11001 +05	<i>Candida nugo sa</i>	71452 +07	<i>Candida albicans 1</i>
11010 +f+ 05	<i>Candida lipolytica</i>	71453 +07	<i>Candida albicans 1</i>
11010 +05	<i>Candida nugo sa</i>	71460 -f+ 05	<i>Candida tropicalis</i>
11040 +05	<i>Candida nugo sa</i>	71461 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
11040 -f+ 21	<i>Geotrichum candidum</i>	71462 +01	<i>Candida sake</i>
11041 +05	<i>Candida nugo sa</i>	71462 +07	<i>Candida albicans 1</i>
11050 +05	<i>Candida nugo sa</i>	71470 -f+ 05	<i>Candida tropicalis</i>
11050 -f+ 21	<i>Geotrichum candidum</i>	71471 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
11400 -04	<i>Prototheca wickerhamii</i>	71472 +01	<i>Candida sake</i>
11400 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71472 +07	<i>Candida albicans 1</i>
11410 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71473 +07	<i>Candida albicans 1</i>
11600 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71524 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
11610 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	71525 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
12400 -04	<i>Candida glabrata</i>	71534 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
13400 -04	<i>Prototheca wickerhamii</i>	71535 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
31002 -07	<i>Candida albicans 2</i>	71553 -05	<i>Candida ciferrii</i>
31042 -07	<i>Candida albicans 2</i>	71560 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
		71561 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
		71564 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
57600 -05	<i>Candida kefyr</i>	70160 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
57601 -05	<i>Candida kefyr</i>	70161 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
57640 -05	<i>Candida kefyr</i>	70170 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
57641 -05	<i>Candida kefyr</i>	70171 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
70160 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>	70400 -04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
70161 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>	70462 +01	<i>Candida sake</i>
70170 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>	70560 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
70171 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>	70561 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
70400 -04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70570 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
70462 +01	<i>Candida sake</i>	70571 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>
70560 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>	70620 +05	<i>Candida lusitanae</i>
70561 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>	70660 +40	<i>Cryptococcus albidus</i>
70570 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>	70661 +40	<i>Cryptococcus albidus</i>
70571 +40	<i>Cryptococcus unguiculatus</i>	70662 +01	<i>Candida sake</i>
70620 +05	<i>Candida lusitanae</i>	70670 +05	<i>Candida lusitanae</i>
70660 +40	<i>Cryptococcus albidus</i>	70760 +40	<i>Cryptococcus albidus</i>
70661 +40	<i>Cryptococcus albidus</i>	70761 +40	<i>Cryptococcus albidus</i>
70662 +01	<i>Candida sake</i>	71002 +07	<i>Candida dubliniensis</i>
70670 +05	<i>Candida lusitanae</i>	71010 +07	<i>Candida dubliniensis</i>
70760 +40	<i>Cryptococcus albidus</i>	71012 +07	<i>Candida dubliniensis</i>
70761 +40	<i>Cryptococcus albidus</i>	71021 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
71002 +07	<i>Candida dubliniensis</i>	71031 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
71010 +07	<i>Candida dubliniensis</i>	71042 +07	<i>Candida albicans 1</i>
71012 +07	<i>Candida dubliniensis</i>	71052 +07	<i>Candida albicans 1</i>
71021 +05	<i>Candida parapsilosis</i>	71061 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
71031 +05	<i>Candida parapsilosis</i>	71071 +05	<i>Candida parapsilosis</i>
71042 +07	<i>Candida albicans 1</i>	71124 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71052 +07	<i>Candida albicans 1</i>	71125 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71061 +05	<i>Candida parapsilosis</i>	71134 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71071 +05	<i>Candida parapsilosis</i>	71135 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71124 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	71164 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71125 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	71165 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71134 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	71174 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71135 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	71175 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71164 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	71324 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71165 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>		
71174 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>		
71175 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>		
71324 -44	<i>Cryptococcus neoformans</i>		
31052 -07	<i>Candida albicans 2</i>	33242 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
31402 -07	<i>Candida albicans 2</i>	33243 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
31442 -07	<i>Candida albicans 2</i>	33262 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
31452 -07	<i>Candida albicans 2</i>	33263 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
31472 -07	<i>Candida albicans 2</i>	33342 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33343 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33362 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33363 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33642 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33643 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33662 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33663 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33742 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33743 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
		33762 -25	<i>Trichosporon asahii</i>
55000 -05	<i>Candida kefyr</i>	55000 -05	<i>Candida kefyr</i>
55001 -05	<i>Candida kefyr</i>	55040 -05	<i>Candida kefyr</i>
55040 -05	<i>Candida kefyr</i>	55041 -05	<i>Candida kefyr</i>
55041 -05	<i>Candida kefyr</i>	57000 -05	<i>Candida kefyr</i>
57000 -05	<i>Candida kefyr</i>	57001 -05	<i>Candida kefyr</i>
57001 -05	<i>Candida kefyr</i>	57010 -05	<i>Candida kefyr</i>
57010 -05	<i>Candida kefyr</i>	57011 -05	<i>Candida kefyr</i>
57011 -05	<i>Candida kefyr</i>	57040 -05	<i>Candida kefyr</i>
57040 -05	<i>Candida kefyr</i>	57041 -05	<i>Candida kefyr</i>
57041 -05	<i>Candida kefyr</i>	57050 -05	<i>Candida kefyr</i>
57050 -05	<i>Candida kefyr</i>	57051 -05	<i>Candida kefyr</i>
57051 -05	<i>Candida kefyr</i>	57200 -05	<i>Candida kefyr</i>
57200 -05	<i>Candida kefyr</i>	57201 -05	<i>Candida kefyr</i>
57201 -05	<i>Candida kefyr</i>	57240 -05	<i>Candida kefyr</i>
57240 -05	<i>Candida kefyr</i>	57241 -05	<i>Candida kefyr</i>
57241 -05	<i>Candida kefyr</i>	57400 -05	<i>Candida kefyr</i>
57400 -05	<i>Candida kefyr</i>	57401 -05	<i>Candida kefyr</i>
57401 -05	<i>Candida kefyr</i>	57440 -05	<i>Candida kefyr</i>
57440 -05	<i>Candida kefyr</i>	57441 -05	<i>Candida kefyr</i>
57441 -05	<i>Candida kefyr</i>		
10000 -25	<i>Geotrichum capitatum</i>	11000 -25	<i>Geotrichum capitatum</i>
10000 +f+ 05	<i>Candida lipolytica</i>	11000 +f+ 05	<i>Candida lipolytica</i>
10000 +05	<i>Candida nugo sa</i>	11001 +05	<i>Candida nugo sa</i>
10010 +f+ 05	<i>Candida lipolytica</i>	11010 +f+ 05	<i>Candida lipolytica</i>
10010 +05	<i>Candida nugo sa</i>	11010 +05	<i>Candida nugo sa</i>
10040 +05	<i>Candida nugo sa</i>	11040 +05	<i>Candida nugo sa</i>
10040 -f+ 21	<i>Geotrichum candidum</i>	11040 -f+ 21	<i>Geotrichum candidum</i>
11041 +05	<i>Candida nugo sa</i>	11050 +05	<i>Candida nugo sa</i>
11050 +05	<i>Candida nugo sa</i>	11050 -f+ 21	<i>Geotrichum candidum</i>
11400 -04	<i>Prototheca wickerhamii</i>	11400 -04	<i>Prototheca wickerhamii</i>
11400 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	11400 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>
11410 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	11600 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>
11600 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>	11610 +f+ 01	<i>Candida zeylanoides</i>
12400 -04	<i>Candida glabrata</i>	12400 -04	<i>Candida glabrata</i>
13400 -04	<i>Prototheca wickerhamii</i>	13400 -04	<i>Prototheca wickerhamii</i>
31002 -07	<i>Candida albicans 2</i>	31002 -07	<i>Candida albicans 2</i>
31042 -07	<i>Candida albicans 2</i>	31042 -07	<i>Candida albicans 2</i>

Code		Code	
71565 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	73653 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71570 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	73661 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71571 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	73662 (+) 25	<i>Trichosporon</i> spp
71574 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	73663 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
71575 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	73670 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
71620 v 05	<i>Candida lusitanae</i>	73671 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71620 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>	73673 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71630 v 05	<i>Candida lusitanae</i>	73741 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71660 (+) 05	<i>Candida tropicalis</i>	73742 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
71660 v 05	<i>Candida lusitanae</i>	73743 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
71661 v 05	<i>Candida lusitanae</i>	73751 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71662 v 01	<i>Candida sake</i>	73753 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71670 (+) 05	<i>Candida tropicalis</i>	73761 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71670 v 05	<i>Candida lusitanae</i>	73762 (+) 25	<i>Trichosporon</i> spp
71670 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>	73763 (+) 25	<i>Trichosporon</i> spp
71671 + 05	<i>Candida guilliermondii</i>	73771 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71671 v 05	<i>Candida lusitanae</i>	73773 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp
71672 v 01	<i>Candida sake</i>		
71724 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	74000 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
71725 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	74020 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
71734 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	74361 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
71735 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	74371 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
71764 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	74400 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
71765 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	74420 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
71774 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	74560 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
71775 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>	74561 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
		74570 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
		74571 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
72762 - 25	<i>Trichosporon inkin</i>	74660 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
72763 - 25	<i>Trichosporon inkin</i>	74661 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
		74760 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
73242 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>	74761 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
73243 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>	74771 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
73262 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>		
73263 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>	75000 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
73342 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>	75020 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
73343 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>	75124 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
73362 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>	75125 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
73363 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>	75134 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
73641 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp	75135 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
73642 (+) 25	<i>Trichosporon</i> spp	75164 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
73643 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>	75165 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
73651 (+) 21	<i>Trichosporon</i> spp		

Présentation de la galerie Auxacolor 2 :

La galerie dispose de 16 tests biochimiques repartis dans des cupules, dont :

- 13 tests colorimétriques comportant différents types de sucres : Glucose GLU(constitue le témoin positif),Maltose (MAL) ,Saccharose (SAC), Galactose (GAL) ,Lactose (LAC), Raffinose (RAF), Inositol(INO), Cellobiose (CEL), Trehalose (TRE), Adonitol (ADO) , Melezitose (MEL) , Xylose (XYL), Arabinose(ARA).
- Un test enzymatique hexosaminidase (HEX) permet la détection de l'activité N-acétyl-galactosaminidase.
- Et un test phenoloxydase (POX) permet de détecter l'activité phenoloxydasique ou de la proline-arylamidase (PRO).

-L'extraction des huiles essentielles était entreprise par la procédure de l'hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger, au laboratoire des « Produits Naturels », Faculté de Biologie , Tlemcen.

-Après que la plante *Thymus fontanesii* était séchée à l'ombre pendant quinze jours, fragmentée en petits morceaux et pesée, elle était ensuite trempée dans un ballon à fond rond, rempli d'eau jusqu'au trois quart.

-Le ballon était placé dans l'appareil de distillation sur le chauffe -ballon, dès que l'eau se portait à ébullition, l'évaporation acheminait l'huile volatile à travers le système de refroidissement qui condensait l'eau , la séparant ainsi de la couche de l'huile essentielle recueillie.

-La distillation était poursuivie pendant une durée de 2h30.

-Les boutons floraux séchés de *Syzygium aromaticum* étaient aussi pesés et broyés ; la même procédure d'hydrodistillation était réalisée pour l'extraction de l'huile essentielle de Girofle.

Annexe 7 : Protocole de l'analyse chimique par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrophotométrie de Masse « CPG-SM »

➤ Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

L'appareil est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un injecteur diviseur et de deux colonnes capillaires de dimensions (50 m x 0,22 mm ; épaisseur du film : 0,25 µm), apolaire (BP-1, polyméthylsiloxane) et polaire (BP-20, polyéthylène glycol).

• Conditions opératoires

- La température de l'injecteur et du détecteur est de 250°C
- La température est programmée depuis 60°C jusqu'à 220°C, à raison de 2°C/min
- Le gaz vecteur est l'hélium (0,8 mL/min)
- L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/60
- La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,1 µL.

➤ Analyse par Spectrométrie de Masse (SM)

Les analyses étaient réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer TurboMass doté d'un injecteur automatique et d'une colonne capillaire de silice fondue (50 m x 0,22 mm, épaisseur du film 0,25 µm), BP-1 (diméthylpolysiloxane), couplé à un détecteur de masse Perkin-Elmer TurboMASS.

-Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique.

-La température de la source est de 250°C.

-Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 40-400 Da.

-Le gaz vecteur est l'hélium (0,8 mL/min)

-La température linéaire est programmée depuis 60°C jusqu'à 220°C, à raison de 2°C/min, suivie d'un palier de 20 min à 220°C ;

-L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/60.

-La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,5 µL.

Méthode d'évaluation de l'activité antifongique des HEs par la méthode de diffusion sur disque :
méthode de l'aromatogramme

-Un disque de papier filtre de 6 mm de diamètre, imprégné de d'huile essentielle (15 µL HE + 5 µL de DMSO) de *Thymus fontanaesii* et de *Syzygium aromanticum* était déposé à la surface du milieu gélosé dans des boîtes de Pétri, préalablementensemencées en nappe avec 1 mL de suspension microbienne préparé à partir d'une phase exponentielle de croissance et évaluée sur un spectrophotomètre à 0,12 -0,15 , $\lambda = 530 \text{ nm}$ (10^6 UFC/ mL)

Placés en incubation à 30°C pendant 24h

-Les contrôles positif et négatif étaient représentés par des disques imprégnés de Fluconazole (25 µg) et de DMSO (20 µL/disque)

-Tous les essais étaient réalisés en duplicata.

Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI et de la concentration minimale fongicide CMF des huiles essentielles :

-Dans une microplaque de 96puits à fond plat (FALCON® ,USA), à raison d'une plaque par produit(Thym, Girofle, Combinaison) , 100µL de chaque souche, était déposée dans les puits réservés aux différentes concentrations.

-Une aliquote 1600 µL de chacune des souches, était ajoutée à la concentration de 0,250µL/mL d'HE de Thym, qui représentait le palier maximal des concentrations testées, avec 0,2µL de DMSO.

-200µL de cette solution mère était placée dans les premiers puits réservé au palier maximal .

-100µL était distribuée en cascades sur le reste des puits (dilution de ½)

-Le contrôle négatif était représenté par le milieu avec DMSO,

-Le témoin de contrôle de la stérilité du milieu était le milieu seul.

-Les plaques étaient placées au frais à 4°C pendant 2 h pour assurer la diffusion des substances, et incubées à 30°C pendant 24 h.

-Une concentration de 1 µL/mL était testée comme palier maximal pour l'HE de Girofle.

-La même procédure de manipulation était effectuée pour l'huile de Girofle et la combinaison des deux huiles.

-Un mélange à part égale des solutions mères des huiles essentielles de Thym et de Girofle était testé pour évaluer l'effet combinatoire des huiles.

- Les essais étaient refaits trois fois en duplicata.
- La lecture de l'absorbance était effectuée grâce au lecteur de plaque (SPECTROstar Nano)
- La plus petite concentration dont le puit ne montrait aucune croissance visible représentait la CMI.
- Les géloses étaient ensuiteensemencées avec 100µL du contenu des puits ayant une concentration \geq la CMI, et incubées de nouveau à 30°C pendant 24h.
- la plus petite concentration dont la boîte de pétri contenait au plus une levure sur 10 000 était qualifiée de CMF.

Annexe 9 : Pré formulation et Formulation du Gel buccal

« Les gels hydrophiles (hydrogels) sont des préparations dont l'excipient est habituellement de l'eau, du glycérol ou du propylène glycol gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés tels que l'amidon, des dérivés de la cellulose, des carbomères ou des silicates de magnésium-aluminium »^[60].

1. La pré formulation pharmacologique du gel buccal

La pré formulation consiste à étudier les caractéristiques physiques, chimiques et technologiques des matières premières nécessaires pour établir une forme pharmaceutique sûre, stable et efficace.

Donc nous allons établir une carte d'identité des huiles essentielles pour définir leur solubilité, sensibilité à la lumière, au pH, à l'oxygène.

1.1) Huile essentielle de *Thymus fontanesii* (Thym)[60]

Le Thymol ou le Carvacrol étant les composés majoritaires.

Le Carvacrol, C₁₀H₁₄O, 5-Isopropyl-2-méthylphénol.

Masse molaire : 150,2g/mol ; Liquide brunâtre, pratiquement insoluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol à 96%. Conservation : récipient étanche, à l'abri de la lumière

1.2) Huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (Girofle) [60]

L'Eugénol étant le composé majoritaire :

- Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 70% (01 volume d'eugénol est soluble dans 02 volumes d'éthanol), pratiquement insoluble dans le glycérol, miscible à l'éthanol à 96%, à l'acide acétique glacial, au chlorure de méthylène et aux huiles grasses.
- Conservation : A l'abri de la chaleur, à l'abri de la lumière.

2. Présélection des excipients

A partir des excipients nécessaires à la fabrication d'un hydrogel nous avons établi une liste des excipients compatibles avec les deux huiles essentielles (Tableau n° XXXX).

Tableau n° XXXX: Tableau de sélection des excipients [192].

Nature du produit	Excipients	Propriétés
Humectant	Glycérol	Emollient ; humectant. Soluble dans l'eau, dans l'éthanol 95%. Insoluble dans les solutions lipidiques, Hygroscopique.
	Propylène glycol	Solubilité : miscible avec l'éthanol 95%, la glycérine et l'eau ; Non miscible avec les huiles fixes, et dissous certaines huiles essentielles. Hygroscopique, sensible à la lumière.
Géifiants	Amidon	Liant, épaississant naturel. Acidité- alcalinité : pH=5,5-6,5 pour une solution aqueuse à 2% poids /volume à 25°C. Aucune incompatibilité.
	Carbomer	Agent augmentant la viscosité, agent émulsifiant. Agent géifiant : 0,5-2,0% Acidité- alcalinité : pH = 2,7-3,5 pour une dispersion aqueuse 0,5% P/V, pH = 2,5-3 pour dispersion aqueuse 1% poids /volume. Soluble dans l'eau et soluble dans l'éthanol 95% et dans le glycérol après neutralisation, Hygroscopique.
Ajustement du pH	Triethanolamine	Agent alcalinisant ; agent émulsifiant. Acidité/alcalinité : pH = 10,5 (solution 0,1 normale) Solubilité : Miscible à l'eau et à l'éthanol.
Solvants	Ethanol	Conservateur antimicrobien Solubilité : miscible à l'eau et au glycérol et au chlorure de méthylène. Incompatibilité : Dans des conditions acides, les solutions d'éthanol peuvent réagir avec des matières oxydantes. Les mélanges avec des alcalis peuvent s'assombrir en couleur en raison d'une réaction avec des quantités résiduelles d'aldéhyde. Les solutions d'éthanol sont également incompatibles avec les récipients en aluminium.
	Eau purifiée ou distillée	Solubilité : miscible avec les solvants polaires Incompatibilité : Dans les formulations pharmaceutiques, l'eau peut réagir avec les excipients qui sont sensibles à l'hydrolyse (décomposition en présence d'eau ou d'humidité) aux températures ambiante et élevée.

3. Formulation Du Gel Buccal

Au cours de la formulation nous avons réalisé une succession de choix pour établir une formule unitaire quantitative, définir la méthode et les conditions de préparation, les articles de conditionnement et les conditions de conservations.

En fonction des caractéristiques des huiles essentielles nous avons réalisé une succession de choix afin de formuler un médicament efficace et stable.

3.1 Choix de la forme galénique

Afin d'optimiser l'action des huiles essentielles, la forme galénique dont l'application la plus aisée, était choisie : celle du « **Gel Buccal** » qui permettait un dosage précis des principes actifs avec un contact prolongé sur le site d'action, surtout que les muqueuses orales ont une meilleure capacité d'absorption.

3.2 Choix de la formule qualitative

Le produit final se devait d'être un produit de phytothérapie, cependant le but était de formuler un gel à base d'excipient basique, sans utiliser beaucoup de produits chimiques, afin de rester dans le contexte de produits naturels.

La formule du gel était choisie en fonction des caractéristiques des huiles essentielles (leur solubilité et stabilité) et des caractéristiques des excipients gélifiants et émoullissants (leur solubilité, compatibilité et pouvoir gélifiant) par conséquent les excipients sélectionnés étaient :

- ✓ **Amidon de Maïs**
- ✓ **Glycérol**
- ✓ **Propylène Glycol**
- ✓ **Eau Distillée.**

L'ensemble de ces produits nous ont été fourni par une firme algérienne de renommée EL KENDI Algérie, et n'ont pas nécessité de contrôle. Ces excipients ont démontré, dans les préparations pharmaceutiques, leur stabilité et leur homogénéité.

3.3 Choix du conditionnement

Le conditionnement se doit d'isoler la préparation de la lumière et éviter l'introduction de l'air à l'intérieur de la préparation. **Le Tube en aluminium** était le conditionnement choisi, operculé avec un bouchon vissé.

3.4 Préparation d'un gel de base sans huiles essentielles

Un gel base a été formulé en premier, à partir des excipients seulement, afin de valider la consistance du produit et puis de démontrer son inefficacité vis-à-vis des souches fongiques et son innocuité vis à vis des cellules humaines.

3.5 Choix de la formule quantitative

La concentration de l'agent antifongique retenue pour être incorporer dans le futur gel était la concentration minimale fongicide de la combinaison des deux huiles essentielles CMF, en effet nous avons pris en compte l'environnement buccal dans lequel sera placé le futur gel buccal qui risquerait d'être rapidement éliminé en présence de la salive d'une part et par le système d'épuration (ou de desquamation) de l'épithélium oral, pour cela, nous avons opter pour une concentration plus

importante que la CMI afin d'obtenir un effet antifongique maximal pendant la biodisponibilité du produit dans la sphère orale.

3.6 Choix de la méthode de fabrication :

Les concentrations minimales fongicides très faible des huiles essentielles nous avait amené à proposer la méthode de fabrication décrite ci-dessous. La manipulation des huiles essentielles se faisait à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation.

Plusieurs formules étaient préparées en faisant varier les quantités des excipients dans la préparation. Les préparations obtenues étaient examinées et sélectionnées selon leur consistance et leur aspect visuel.

4 Préparation de la base du gel et du gel buccal fini

4.1 Préparation du gel base : Mélange des Excipients

Les ingrédients étaient pesés avec précision et préparés au préalable. La quantité d'amidon était dispersée en premier dans l'eau froide, le glycérol était ajouté en mélangeant le tout manuellement. La préparation était ensuite chauffée jusqu'à 100°C sous agitation régulière et continue 4000trs/mn. La gélification du mélange était obtenue après refroidissement, et du propylène glycol était ajouté à l'abri de la lumière sous agitation manuelle. Au final nous avons obtenu un gel base de consistance légèrement épaisse, qui coule lentement, de couleur blanche opaque et sans odeur particulière.

4.2 Préparation du gel buccal avec les huiles essentielles

La même procédure de préparation était adoptée pour la préparation du gel buccal incorporé d'huiles essentielles ; dont la quantité était calculée à partir de leur concentrations minimales fongicides, en fonction du volume final du gel de base.

Les huiles essentielles étaient ajoutées au propylène glycol en mélangeant, afin de les solubiliser en premier, puisqu'elles sont lipophiles. Puis l'ensemble était mélangé à la préparation initiale du gel base.

Plusieurs essais ont été effectués pour déterminer le volume final, et la quantité des ingrédients de la base, afin d'éviter tout phénomène d'absence de gélification, de déphasage ou d'apparition de grumeaux.

Le produit était conditionné dans des tubes en aluminium operculés avec bouchon en plastique et conservé pour une période de trois semaines (dans l'attente des tests de conservation)

La formule quantitative unitaire (pour un seul tube) n'a pas été communiquée dans ce travail, en raison de la constitution d'une demande d'acquisition de la propriété intellectuelle de ce produit « Gel buccal ». Cependant, la formule qualitative est précisée dans le Tableau n°_XXXXI.

Tableau n° XXXXI : Composition du produit fini « gel buccal »

	Constituants du gel buccal fini	Composition
Principes actifs	Huile essentielle de Thym	8,6µL
	Huile essentielle de Girofle	34,3µL
Excipients	Amidon de maïs	QSP (Quantité Suffisante Pour un tube)
	Eau distillée	
	Glycérol	
	Propylène glycol	
	Volume total de gel base	68,6 mL

Annexe 10 : Réalisation au laboratoire des pastilles en résine acrylique

Cette étape a eu lieu au laboratoire de Prothèse Dentaire de la Faculté d'Odontologie de l'Université de Reims – Champagne Ardenne.

1. Confection des pastilles en résine :

- Deux plaques de cire de 1,5m de diamètre ont été accolées avec une source de chaleur,
- La cire a été découpée en petites pastilles, en forme de disques avec 2 surfaces planes, à l'aide d'un emporte-pièce en cuivre (confectionné à cet effet) ayant un diamètre de $12\text{mm} \pm 0,1\text{mm}$ et d'une épaisseur de $3\text{mm} \pm 0,1\text{ mm}$.
- Après vérification de leur standardisation, les lamelles en cire ont été mise en moufle et ébouillantées.



Figure n° 93 : Résine thermo polymérisable qui a servie à réaliser les pastilles.

- La résine méta-acrylate ProBase® Hot Acrylic Resin « Ivoclar Vivadent Inc » a été préparée selon le dosage du fabricant : 10 mL de monomère pour une dosette de polymère.
- Les moufles ont été bourrées de résine, passés sous presse manuelle, puis placé dans un polymérisateur à bain marie pendant 4h40 à 90°C, pour cuisson.
- Un dégrossissage a été entrepris afin de supprimer les bavures périphériques avec une meule en carbure de tungstène montée sur pièce à main, l'intrados n'a pas été retouché sauf en présence d'épines ou de bulles.
- Une seule face a été polie, afin de simuler l'extrados prothétique, à l'aide d'une brosse à polir avec de la pierre ponce, et à l'aide d'un feutre avec la pâte Dialux.
- Les pastilles déformées et ne respectant pas la forme standard étaient retirées de l'étude.

2. Désinfection des pastilles :

Les pastilles étaient stérilisées à l'aide d'une lumière ultraviolet activée dans un poste de sécurité microbiologique (PSM) Steril-VBH™ 72 MP pendant 10min sur chaque face.

Annexe 11 : Formulaire d'information et de Consentement éclairé du patient

Centre hospitalo-universitaire Robert Debré -Reims
Service de Médecine Buccodentaire- Chirurgie orale.

Formulaire d'information et de Consentement éclairé du patient

Je donne mon accord pour que des échantillons de la muqueuse orale me concernant puissent être prélevés et utilisés à des fins de recherche scientifique, et /ou pour le développement de produits qui pourraient être publiés.

J'ai bien compris que ma participation était volontaire et que je suis libre de modifier ou révoquer mon consentement à tout moment sans aucune justification, sans que cela n'ait de conséquence sur mon suivi médical.

J'ai pu poser toutes les questions à l'équipe médicale et m'assurer que les résultats et les informations communiquées ne permettront pas d'identifier ma personne.

J'ai bien conscience qu'aucun bénéfice financier ne peut être attendu des recherches scientifiques qui pourront être faites grâce à mes échantillons.

Partie réservée au patient donnant son consentement :	Partie réservée au médecin ayant donné l'information :
Nom et prénom : _____	Nom : _____
Fait à : _____	Etablissement/Service : _____
Le : _____	_____
Signature :	Signature :

Annexe 12 : Culture cellulaire des fibroblastes gingivaux humains

Provenance des échantillons de la muqueuse :

-Les tissus gingivaux humains ont été obtenus en tant que restes de tissus provenant de donneurs consentants en bonne santé systémique et parodontale.

- **Culture primaire :**

-Après une étape de lavage, la couche épithéliale du tissu gingival a été éliminée et le tissu conjonctif a été coupé en petites tranches de 1 à 3mm, et placé dans une flasque de culture de 25 cm²(T25) pendant 10 minutes à 37°C pour permettre à l'explant de sécher légèrement, améliorant ainsi l'adhésion des explants à la surface du culture.

-Après la fixation, le milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle, enrichi de sérum bovin fœtal (SVF) et d'antibiotique, a été ajouté aux explants tissulaires et maintenu dans des conditions de culture cellulaire, pendant au moins une semaine avant le renouvellement du milieu.

-Les conditions de la réalisation d'une culture cellulaire :

- Une oxygénation des cellules (O₂ =18% ,CO₂ = 5%), Un pH physiologique à 7,4 , Une température de 37°C , Une atmosphère humidifiée constante à 5%.

- L'ensemble des manipulations étaient effectuées en aseptise, dans une hotte à flux laminaire

-Les cellules migraient hors de l'explant pour coloniser la surface du flasque. Le milieu était ensuite remplacé deux fois par semaine jusqu'à confluence, obtenue environ au bout de trois semaines.

- **Culture secondaire : passage / repiquage ou mise en plaque**

Une fois à confluence, le milieu retiré, les cellules étaient trypsinisées avec de la Trypsine (EDTA, GIBCO®,1,5 ml à 0,05%) 3ml pour une flasque T25, à 37°C pendant 5min.

-L'observation des cellules s'effectuait sous un microscope inversé à écran, où l'éclairage se trouve au-dessus de la platine et les objectifs en dessous (grossissement ×2, ×4, ×10, × 20)

-Les cellules étaient contrôlées au microscope afin de vérifier qu'elles étaient toutes décrochées du fond de la flasque, pour être transférées dans un falcon complété par du PBS.

-Les falcons sont passer en centrifugation pendant 10min à 20°C à 500g maximum.

-Les débris ainsi que les cellules mortes se trouve dans le surnagent et le culot cellulaire est repris etensemencées dans des flasques de 25 cm² contenant du milieu DMEM préparé.

-Chaque passage correspond à environ une semaine de culture.

-Les cellules étaient trypsinisées lorsqu'elles atteignaient 80% à 90% de confluence dans la boîte de façon à rester dans la phase exponentielle de croissance pour être réparties dans les puits après comptage sur la lame de Thoma.

Comptage cellulaire à l'aide de la cellule de numération Thoma :

-Une dilution au 1/2 des cellules dans du bleu trypan était réalisée.

-Le bleu trypan étant un colorant expulsé activement des cellules vivantes, il est possible de différencier ces dernières des cellules mortes qui se teintent en bleu.

-5µL des cellules colorées au bleu de Trypan était déposée de part et d'autre sur la lamelle, le nombre de cellules viables sur les deux carrés de la lame était visualisé sous microscope (à grossissement × 40)

-Le comptage cellulaire permettait de connaître le nombre de cellules contenues dans une flasque mise en culture. Les cellules sont dénombrées dans chaque carré de la lame. Le nombre total de cellules dans le culot cellulaire était calculé grâce à la formule suivante : [145, 166]

$$\text{Nombre de cellules} = \frac{\text{Cellules totales comptées: } n1+n2}{\text{Volume d'un carré} \times \text{Nombre de carrés}} \times 10\,000$$

Les cellules sont dénombrées dans chaque partie de la lame (n).

10 000 cellules / mL ont été placés dans les 24 puits d'une microplaque, à raison de 500µL par puit.

Les manipulations ont été refaites 3fois.

-Six souches de cellules fibroblastes gingivaux de six donneurs sains (FGH1, FGH2, FGH3), étaient réparties chacune dans une plaques de 24 puits.

-Les cellules étaient cultivées pendant 24h avant d'être traitées par les produits.

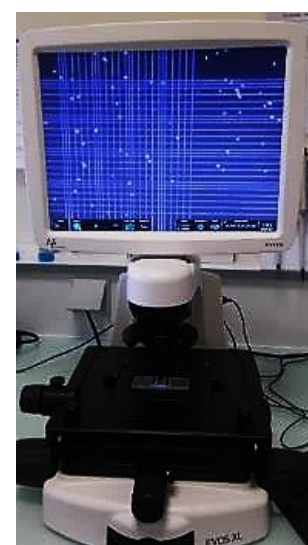
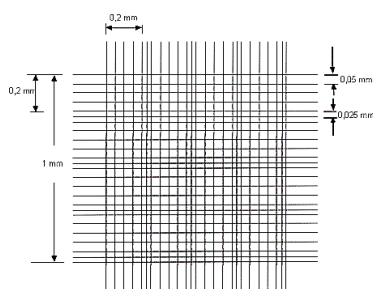


Figure n° 94: Comptage des FGH sur la cellule de Thoma [64]

Evaluation de l'activité cellulaire par WST-1

- Préparer et aliquoter (1mL) la solution de WST-1 (Cat. No. 11 644 807 001, *Roche*, distribué par *Sigma Aldrich*). Si présence de particule dans le flacon, faire chauffer à 37°C jusqu'à dissolution
- Conserver à -20°C

En plaque 96 puits :

- Oter le surnageant (le réserver pour dosage de la LDH)
- Ajouter 110 µL du mélange : milieu de culture + WST-1 (ex : 10 mL de milieu + 1 mL de WST-1)
- Incuber à 37 °C jusqu'à obtenir un virage coloré du rouge vers le jaune/orange (à titre indicatif 50 min pour des ostéoblastes ou Saos-2, 20-30 min pour des MG-63)
- Transférer 90 µL de surnageant en plaque 96 puits fond plat
- Effectuer la lecture au spectrophotomètre à 440 nm corrigée > à 750 nm
- Témoin mortalité 10 ng/mL
- Témoin viabilité cellules en culture basale
- Blanc : milieu de culture + wst-1 (sans cellule)

Mesure de l'activité LDH dans les surnageants des cellules

- Nous avons utilisé le *Roche Cytotoxicity Detection Kit* selon les recommandations du fournisseur.
- 50µL de surnageant de culture ont été ajoutés à 50 µL de mélange réactionnel (*Catalyst* 1,1 µL, *Dye Solution* 48,9 µL) reconstitué extemporanément. Les tests ont été réalisés en duplicata.
- L'activité LDH dans les surnageants de culture a été évaluée en mesurant l'absorbance à 492 nm avec correction à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Fluostar Omega.

Mesure de la quantité d'ADN

- L'ADN des fibroblastes était extrait en utilisant le *MasterPure™ DNA purification kit* (Epicentre™ Biotechnologies, France) selon les recommandations du fournisseur.
- Dans les puits contenant les cellules encore congelées, 300 µL d'une solution protéinase K et de *Tissue and Cell Lysis* (1 µL/299 µL) étaient déposés avant de subir 3 cycles d'incubation à 65°C pendant 15 min puis agitation (agitateur elliptique de 30 à 60 g) pendant 1 minute.
- 1µL microlitre de *RNase A* à 5 µg/µL était ajouté par puits à la solution précédente avant incubation à 37°C pendant 30 min.
- Les plaques étaient ensuite placées à -20°C pendant 5 minutes.
- Les lysats étaient récupérés dans des tubes eppendorf de 1,5 mL, puis 150 µL de la solution *MCP Protein Reagent* était ajouté et homogénéisé en vortexant à vitesse maximale (Grant Instruments) pendant 10 sec.
- Une centrifugation à 13000 g à 4°C a été réalisée pendant 10 min pour précipiter les protéines.
- Les surnageants contenant les acides nucléiques ont été récupérés dans des tubes propres contenant 500 µL d'isopropanol (Sigma-Aldrich).
- Ces nouveaux tubes étaient retournés 40 fois pour homogénéiser délicatement les produits puis centrifugés à 13000g à 4°C pendant 10 min pour culotter les acides nucléiques.
- L'isopropanol était évacué par retournement et deux rinçages des culots ont été effectués à l'éthanol 70% (éthanol absolu (Groupe Brabant) dilué dans de l'eau Ultrapure® (Bertin Pharma)). Après évaporation du surplus d'éthanol, les culots sont repris dans 35 µL de *TE buffer*. La quantité d'ADN extrait a été évaluée en mesurant l'absorbance à 260 nm (Nanodrop™, Thermo Scientific). La qualité de l'extraction était appréciée par la mesure du rapport d'absorbance à 260/280 nm.
- Des valeurs supérieures à 1,8 sont considérées comme exploitables.

Annexe 14 : Principes des colorations histologique et immunohistochimique

Après 24 heures d'incubation, des explants gingivaux de même taille, traités ou non, ont été fixés dans du formaldéhyde tamponné (solution de formaldéhyde) au phosphate à 10 % (pH 7,4, à la température ambiante) pendant 24 heures et de la paraffine incorporée après déshydratation d'éthanol à l'aide d'un processeur de tissus Excelsior Shandon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Des coupes de cinq microns d'épaisseur ont été réalisées sur des échantillons enrobés de paraffine entamées à l'aide d'un microtome rotatif AP280, (Leica Microsystems®).

- Etude histologique : Coloration Hématéine Eosine Safran « HES » :

Protocole :

- Déparaffiner et réhydrater les coupes dans l'eau distillée.
- Trempage de la lame dans un bain Hématoxyline pendant 3-4 minutes
- Rinçage à l'eau courante
- Traitement à l'éthanol acide 0,3% HCl quelques secondes
- Rinçage à l'eau courante
- Bain d'eau lithinée pendant 1 minute
- Rinçage à l'eau courante
- Trempage dans une solution d'Éosine-Y pendant 30 minutes.
- Rinçage à l'eau courante, puis déshydratation à l'alcool à 95° puis alcool 100°.
- Colorer dans le safran alcoolique 5 à 8 min.

Les coupes obtenues étaient ensuite observées au microscope optique.

- Etude Immunohistochimique par Coloration Caspase 3:

Après déparaffinage, les sections ont été incubées avec le conditionneur cellulaire « Cell Conditioner 1 » (EDTA, pH 8,4) pendant 64 min, puis inhibées par la peroxydase pré-primaire et incubées avec l'anticorps primaire Caspase-3 (polyclonal lapin, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) à une dilution 1:600 à 37°C pendant 32 min sur coloration automatisée BenchMark XT® (Ventana Medical System).

Ensuite, la réaction de coloration a été réalisée avec le kit UltraView Universal DAB v3 (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA).

La contre-coloration et la post-contre-coloration comprenaient de l'hématoxyline et un réactif de bleuissement.

Les images ont été prises à l'aide d'un iScan Scanner Coreo AU.

Résumé

« Etude comparative de l'effet antifongique entre l'association Carvacrol - Eugénol et le Miconazole contre la stomatite sous prothétique chez l'édenté total appareillé »

La stomatite prothétique (SP), lésion fréquente chez l'édenté total appareillé, causé par le *Candida albicans*. En raison de la récurrence et de la résistance connue aux antifongiques, nous tenterons de comparer l'activité antifongique des plantes de thym et de girofle (contenant le carvacrol et l'eugénol) avec celle du miconazole, et de déterminer leurs concentrations efficaces, par ailleurs la prévalence de la SP était recherchée et l'agent causal identifié.

Matériel et Méthodes : La prévalence de la SP était calculée chez des patients recrutés au service de Prothèse Dentaire de Tlemcen. 78 frottis étaient réalisés sur les prothèses maxillaires visant à rechercher l'agent causal. Les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* (Thym : plante endémique de l'Algérie) et *Syzygium aromanticum* (Clou de girofle : Origine Indonésie) étaient obtenues par hydrodistillation et analysées par CPG-SM. L'activité antifongique d'un gel préparé à base de leur mélange était comparée à celle du Miconazole, ainsi que leur activité anti biofilm testée en expérimentation sur des échantillons de résine acrylique, vis-à-vis des souches *Candida albicans* par micro dilution en mesurant l'absorbance. La cytotoxicité du gel était évaluée sur des fibroblastes gingivaux humains placés en contact direct. Les données étaient traitées par SPSS version 23 et GraphPad version 5.

Résultats : La stomatite prothétique était retrouvée chez 32% de nos patients appareillés. Le *Candida albicans* était isolé sur 59% des prothèses maxillaires, une contamination bi et tri-espèces était aussi relevée. Le Carvacrol et l'Eugénol étaient les principaux composés du Thym et du Clou de girofle. L'huile de thym était la plus active, dose dépendante. Un effet combinatoire des deux huiles essentielles a permis la réduction des concentrations individuelles d'un pallier. L'efficacité antifongique et le caractère anti- biofilm du gel formulé s'est révélée être semblable à celle du Miconazole. Le gel était aussi efficace que le Miconazole. Le gel employé n'était pas toxique sur les fibroblastes gingivaux humains, ni sur les coupes histologiques.

Conclusion : Les résultats que nous avons obtenus sont intéressants et peuvent ouvrir des perspectives d'applications industrielles en pharmaceutique.

Mots-clés : Activité antifongique - Biofilm prothétique - *Candida albicans* - Carvacrol - Cytotoxicité - Eugénol - Huiles essentielles - Stomatite prothétique.

Abstract

"Comparative study of the antifungal effect of the combination of Carvacrol - Eugenol and Miconazole against denture stomatitis in patient complete wearer denture"

Denture stomatitis (DS), a common lesion in toothless, caused by *Candida albicans*. Due to the recurrence and known resistance to antifungals, we will attempt to compare the antifungal activity of thyme and clove plants (containing carvacrol and eugenol) with that of Miconazole, and to determine their effective concentrations, by elsewhere the prevalence of DS was sought and the causative agent identified.

Material and Methods: The prevalence of DS was calculated in patients recruited from the Tlemcen Dental Prosthesis Department. 78 smears were performed on the maxillary prostheses to look for the causative agent. The essential oils of *Thymus fontanesii* (Thyme: plant endemic to Algeria) and *Syzygium aromaticum* (Clove: Origin Indonesia) were obtained by hydrodistillation and analyzed by CPG-SM. The antifungal activity of a gel prepared on the basis of their mixture was compared with that of Miconazole, as well as their anti-biofilm activity tested in experimentation on acrylic resin samples, vis-à-vis *Candida albicans* strains by micro dilution in measuring absorbance. The cytotoxicity of the gel was evaluated on human gingival fibroblasts placed in direct contact. The data was processed by SPSS version 23 and GraphPad version 5.

Results: Prosthetic stomatitis was found in 32% of our fitted patients. *Candida albicans* was isolated on 59% of the maxillary prostheses, a bi and tri-species contamination was also noted. Carvacrol and Eugenol were the main compounds in Thyme and Cloves. Thyme oil was the most active, dose dependent. A combination effect of the two essential oils has made it possible to reduce individual concentrations by one level. The antifungal efficacy and the anti-biofilm character of the formulated gel was found to be similar to that of Miconazole. The gel was as effective as Miconazole. The gel used was not toxic to human gingival fibroblasts, nor to histological sections.

Conclusion: The results we have obtained are interesting and can open up prospects for industrial applications in pharmaceuticals.

Keywords: Denture stomatitis -*Candida albicans*- Denture plaque -Essential oils – Thyme - Clove- Carvacrol – Eugenol -Antifungal activity – Cytotoxicity.

الملخص

أفة شائعة في بلا أسنان ، تسببها المبيضات البيض .بسبب التكرار والمقاومة المعروفة لمضادات ، (SP) التهاب الفم التعويضي الفطريات ، سنحاول مقارنة النشاط المضاد للفطريات لنباتات الزعتر والقرنفل) التي تحتوي على كارفاكروول والأوجينول (مع نشاط ميكونازول ، وتحديد تركيزاتها الفعالة ، عن طريق في مكان آخر ، تم البحث عن انتشار مرض التصلب العصبي المتعدد وتحديد العامل المسبب

المواد والطرق :تم حساب معدل انتشار مرض التصلب العصبي المتعدد في المرضى المعينين من قسم الأسنان الاصطناعية في تلمسان .تم إجراء 78 مسحة على الأطراف الاصطناعية للفك العلوي للبحث عن العامل المسبب .تم الحصول على الزيوت القرنفل :أصل) Syzygium aromaticum) الزعتر :نبات مستوطن في الجزائر (و Thymus fontanesii الأساسية من تمت مقارنة النشاط المضاد للفطريات للجيل المحضر على .CPG-SM إندونيسيا (عن طريق التقطير المائي وتحليلها بواسطة أساس الخليط مع نشاط الميكونازول ، بالإضافة إلى نشاطهم المضاد للبيوفيلم الذي تم اختباره في التجارب على عينات راتنجيات الأكريليك ، مقابل سلاطات المبيضات البيضاء عن طريق التخفيف الدقيق في قياس الامتصاصية .تم تقييم السمية الخلوية للجيل على والإصدار 23 من SPSS الخلايا الليفية اللثوية البشرية الموضوع في اتصال مباشر .تمت معالجة البيانات بواسطة الإصدار 5 من GraphPad.

النتائج: تم العثور على التهاب الفم الاصطناعي في 32 ٪ من مرضانا المجهزة .تم عزل المبيضات البيضاء على 59 ٪ من المركبات الرئيسية في Eugenol و Carvacrol الأطراف الصناعية الفكية ، ولوحظ أيضا تلوث ثنائي وثلاثي الأنواع .كان الزعتر والقرنفل .كان زيت الزعتر الأكثر نشاطاً وتعتمد على الجرعة .أتاح تأثير مزيج من الزيوت الأساسية اثنين من الحد من تركيزات الفردية بمقدار مستوى واحد .تم العثور على الفعالية المضادة للفطريات وشخصية مضاد الغشاء الحيوي للهلام المركب كان الجل المستخدم غير سامة للخلايا الليفية البشرية اللثة ، ولا Miconazole لتكون مماثلة لميكونازول .الجل كان فعالاً مثل للأقسام النسيجية

الخلاصة: إن النتائج التي حصلنا عليها مثيرة للاهتمام ويمكن أن تفتح آفاقاً للتطبيقات الصناعية في مجال الأدوية

الكلمات الرئيسية

- التهاب الفم الاصطناعي - المبيضات البيضاء - الأغشية الحيوية الاصطناعية - الزيوت الأساسية - الزعتر - القرنفل - كارفاكروول - الأوجينول - نشاط مضاد للفطريات - السمسة

Résumé

« Etude comparative de l'effet antifongique entre l'association Carvacrol - Eugénol et le Miconazole contre la stomatite sous prothétique chez l'édenté total appareillé »

La stomatite prothétique (SP), lésion fréquente chez l'édenté total appareillé, causé par le *Candida albicans*. En raison de la récurrence et de la résistance connue aux antifongiques, nous tenterons de comparer l'activité antifongique des plantes de thym et de girofle (contenant le carvacrol et l'eugénol) avec celle du miconazole, et de déterminer leurs concentrations efficaces, par ailleurs la prévalence de la SP était recherchée et l'agent causal identifié.

Matériel et Méthodes : La prévalence de la SP était calculée chez des patients recrutés au service de Prothèse Dentaire de Tlemcen. 78 frottis étaient réalisés sur les prothèses maxillaires visant à rechercher l'agent causal. Les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* (Thym : plante endémique de l'Algérie) et *Syzygium aromanticum* (Clou de girofle : Origine Indonésie) étaient obtenues par hydrodistillation et analysées par CPG-SM. L'activité antifongique d'un gel préparé à base de leur mélange était comparée à celle du Miconazole, ainsi que leur activité anti biofilm testée en expérimentation sur des échantillons de résine acrylique, vis-à-vis des souches *Candida albicans* par micro dilution en mesurant l'absorbance. La cytotoxicité du gel était évaluée sur des fibroblastes gingivaux humains placés en contact direct. Les données étaient traitées par SPSS version 23 et GraphPad version 5.

Résultats : La stomatite prothétique était retrouvée chez 32% de nos patients appareillés. Le *Candida albicans* était isolé sur 59% des prothèses maxillaires, une contamination bi et tri-espèces était aussi relevée. Le Carvacrol et l'Eugénol étaient les principaux composés du Thym et du Clou de girofle. L'huile de thym était la plus active, dose dépendante. Un effet combinatoire des deux huiles essentielles a permis la réduction des concentrations individuelles d'un pallier. L'efficacité antifongique et le caractère anti- biofilm du gel formulé s'est révélée être semblable à celle du Miconazole. Le gel était aussi efficace que le Miconazole. Le gel employé n'était pas toxique sur les fibroblastes gingivaux humains, ni sur les coupes histologiques.

Conclusion : Les résultats que nous avons obtenus, sont intéressant et peuvent ouvrir des perspectives d'applications industrielles en pharmaceutique.

Abstract :

Denture stomatitis (DS), a common lesion in toothless, caused by *Candida albicans*. Due to the recurrence and known resistance to antifungals, we will attempt to compare the antifungal activity of thyme and clove plants (containing carvacrol and eugenol) with that of Miconazole, and to determine their effective concentrations, by elsewhere the prevalence of DS was sought and the causative agent identified.

Material and Methods: The prevalence of DS was calculated in patients recruited from the Tlemcen Dental Prosthesis Department. 78 smears were performed on the maxillary prostheses to look for the causative agent. The essential oils of *Thymus fontanesii* (Thyme: plant endemic to Algeria) and *Syzygium aromanticum* (Clove: Origin Indonesia) were obtained by hydrodistillation and analyzed by CPG-SM. The antifungal activity of a gel prepared on the basis of their mixture was compared with that of Miconazole, as well as their anti-biofilm activity tested in experimentation on acrylic resin samples, vis-à-vis *Candida albicans* strains by micro dilution in measuring absorbance. The cytotoxicity of the gel was evaluated on human gingival fibroblasts placed in direct contact. The data was processed by SPSS version 23 and GraphPad version 5.

Results: Prosthetic stomatitis was found in 32% of our fitted patients. *Candida albicans* was isolated on 59% of the maxillary prostheses, a bi and tri-species contamination was also noted. Carvacrol and Eugenol were the main compounds in Thyme and Cloves. Thyme oil was the most active, dose dependent. A combination effect of the two essential oils has made it possible to reduce individual concentrations by one level. The antifungal efficacy and the anti-biofilm character of the formulated gel was found to be similar to that of Miconazole. The gel was as effective as Miconazole. The gel used was not toxic to human gingival fibroblasts, nor to histological sections.

Conclusion: The results we have obtained are interesting and can open up prospects for industrial applications in pharmaceuticals.

Mots-clés : Activité antifongique - Biofilm prothétique - *Candida albicans* - Carvacrol - Cytotoxicité - Eugénol - Huiles essentielles - Stomatite prothétique.

Directeur de Thèse :

Pr Nouredine SENOUCI
Service de Prothèse Dentaire d'Oran

Co-Directrice de Thèse :

Pr Djamila BOUZIANE
Service de Parodontologie d'Oran

Présenté par :

Imane AZZOUNI
Service de Prothèse Dentaire de Tlemcen