

## IMPLICATION DES MARQUEURS SALIVAIRES OXYDATIFS ET IMMUNOLOGIQUES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'UNE PARODONTITE AGRESSIVE

SENOUCI S.<sup>(1,2)</sup>, BOUZIANE D.<sup>(2,3)</sup>, AIT YAHIA D.<sup>(4)</sup>, MEHADJ<sup>(5)</sup>, BENMAHDI L.<sup>(6)</sup>.

1) Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université d'Oran 1.

2) Laboratoire de Recherche de Biologie Buccale.

3) Service Parodontologie, Département de Médecine Dentaire, Faculté de Médecine, Université d'Oran 1.

4) Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université D'Oran 1.

5) Service Laboratoire Central, Unité Immunologie HMRU Oran.

6) Service Laboratoire Central, HMRU Oran.

salima.senouci@yahoo.fr

### RÉSUMÉ :

La parodontite agressive est caractérisée par une destruction rapide des tissus parodontaux, survenant dans une population jeune et aboutissant à une perte prématurée des dents. La salive possède de puissants systèmes de défense antioxydants qui neutralisent les dommages oxydatifs. Cependant, l'analyse des biomarqueurs oxydatifs et immunologiques dans la salive peut fournir une évaluation globale de l'état de la parodontite. Les objectifs de ce travail est de vérifier l'hypothèse de l'existence de relations entre le stress oxydatif et la parodontite, et de préciser l'interaction des marqueurs immunologiques dans la progression de cette pathologie. Vingt neuf jeunes patients atteints de parodontite agressive généralisée ou localisée ont été recrutés au service de parodontologie, département de médecine dentaire, CHU d'Oran. Ils ont été soumis à un examen parodontal complet par un parodontiste du service, un prélèvement salivaire a été effectué pour l'étude de la capacité antioxydante totale et l'évaluation du taux des immunoglobulines G et A. Un groupe de contrôle composé de vingt cinq sujets jeunes indemns de maladie parodontale représentait le groupe témoin. La capacité antioxydante totale (CAT), et immunoglobulines (IgG et etIgA) ont été mesurées au niveau de la salive. Nos résultats révèlent une élévation des indices cliniques chez les patients atteints de parodontite agressive, une atténuation de la capacité antioxydante totale par rapport aux sujets témoins. Par ailleurs, les patients présentent des valeurs élevées en IgG et IgA salivaires comparées aux sujets témoins. Des corrélations significatives sont notées entre la profondeur de poche parodontale, la perte d'attache clinique, l'indice gingival et les marqueurs salivaires étudiés. En conclusion, les données ont permis d'apprécier l'impact du stress oxydatif et du système immunitaire dans l'apparition et la progression de la parodontite agressive, suggérant que ces marqueurs sont de véritables outils de diagnostic de la maladie.

*Mots clés : Parodontite agressive, Salive, Paramètres cliniques, Capacité antioxydante totale, Immunoglobulines.*

### ABSTRACT: INVOLVEMENT OF OXIDATIVE AND IMMUNOLOGICAL SALIVARY MARKERS IN PATIENTS WITH AGGRESSIVE PERIODONTITIS.

Aggressive periodontitis is characterized by a more or less accelerated mass destruction of periodontal tissues, occurring in a young population and leading to premature tooth loss. Saliva has powerful antioxidant defense systems that neutralize oxidative damage. An imbalance between the production of free radicals and the availability of antioxidants in saliva appears to be implicated in the etiology of periodontal diseases. However, analysis of the biomarkers oxidative and immunological in the saliva may provide an overall assessment of the periodontitis status. The objective of this study was to verify the hypothesis of the existence of relationship between the oxidative stress and periodontitis and to precise the immunological markers in the progression of the pathology. Twenty nine young patients with generalized or localized aggressive periodontitis were recruited from periodontology center, dental medicine department, CHU of Oran, Algeria, and were subjected to a full periodontal examination by dentist doctor specialist in periodontology of the service. A salivary specimen was taken for the study of the total antioxidant capacity and the evaluation of the immunoglobulin G and A levels. A control group consisting of twenty five young subjects with periodontal health perfect represented the control group. The total antioxidant capacity (TAC), and immunoglobulins (IgG and IgA) levels were measured in saliva. Results: our results revealed elevation in Clinical Parameters in periodontitis patients compared to controls. Attenuation of TAC in saliva was observed in patients as compared to controls. Moreover, patients had great levels of IgG and IgA in saliva. Significant correlations were noted between periodontal pocket depth, clinical attachment loss, gingival index, and salivary markers studied. Our data reported the impact of oxidative stress and immunity system in the apparition and the progression of aggressive periodontitis, suggesting that these markers are the veritable tools of diagnostic disease.

*Key words: Aggressive periodontitis, Clinical Parameters, Saliva, total antioxidant capacity, Immunoglobulins.*

*Tirés à part : SENOUCI S., Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université d'Oran 1.*

## INTRODUCTION

La parodontite agressive, est une pathologie fréquente au Maghreb, elle représente une forme destructrice de maladies parodontales qui se traduit par une lyse osseuse, une mobilité dentaire, puis une perte de dents. Elle apparait à un âge précoce [1]. Cette pathologie est causée par une augmentation du nombre de bactéries et par une diminution des défenses immunitaires de l'organisme. Sa prévalence, très variable selon les études, les populations et les définitions, ne semble pas diminuer malgré l'amélioration des conditions sanitaires. La salive est considérée comme un milieu privilégié pour le diagnostic et/ou le suivi de l'évolution de certaines maladies et de leurs complications par la recherche de marqueurs salivaires [2,3]. De plus, elle permet maintenant d'étudier un certain nombre de pathologies telles que la parodontite. Des travaux ont constaté que la salive est considérée comme la première ligne de défense contre les radicaux libres [4]. Pour lutter efficacement contre les dommages oxydants, la salive est équipée de divers systèmes antioxydants. La pathogénicité de la parodontite agressive n'est pas seulement due à la présence des bactéries mais va dépendre de la réponse de l'hôte, face à cette colonisation bactérienne, les polymorphonucléaires (PMN) agissant comme médiateurs primaires de la réponse de l'hôte contre les parodonto-pathogènes-proliférants. Ils produisent une grande quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et entraînent la destruction des tissus parodontaux [5]. Des études ont montré que lorsqu'une bactérie ou un de ses facteurs de virulence entre en contact avec les cellules de défense PMN, il se produit une explosion respiratoire, de ce fait la consommation de l'oxygène va augmenter tout comme la production des ROS [6]. Plus précisément, un déséquilibre homéostatique entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les systèmes de défense antioxydants a été impliqué dans la pathogenèse de la parodontite avec pour conséquence un stress oxydatif.

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants en faveur des oxydants. Il se développe lorsque les radicaux libres des molécules oxydantes, sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme. Certaines études ont montré une relation positive entre le stress oxydatif et la parodontite [6-9]. Par ailleurs, des études indiquent que la capacité antioxydante totale (CAT) combine les influences de nombreux systèmes enzymatiques et non enzymatiques pour indiquer le pouvoir antioxydant net [10]. Les réponses inflammatoire et immunitaire contribuent au maintien de l'homéostasie du parodonte entre l'hôte et les bactéries parodontopathogènes. Certaines bactéries spécifiques à Gram négatif, telles que les *Aggregatibacter actinomycetem comitans* (Aa), le *Porphyromonas gingivalis* (Pg) et le *Tannerella forsythia* sont fortement liées à la parodontite agressive [11, 12]. Une étude a montré que les bactéries parodontopathogènes telles que l'*Aggregatibacter actinomycetem comitans*, le *Prevotellaintermedia*, l'*Eikenellacorrodens*, le *Bacteroides fragilis* et le *Capnocytophaga sp.* sont identifiées chez les patients atteints d'une parodontite agressive [13].

Pour maintenir l'homéostasie dans la cavité buccale, trois éléments interdépendants contribuent à la défense contre le défi bactérien, ce sont la salive, le tissu gingival (local) et le sérum (systémique) [8].

Les cytokines et les immunoglobulines détectées dans la salive des patients présentant des parodontites sont des marqueurs associés à la réaction immunitaire de l'hôte contre les parodonto-pathogènes [13]. En effet, les immunoglobulines (Ig) A salivaires jouent un rôle majeur dans la prévention de l'adhérence des microorganismes aux sites muqueux, en activant la voie

alternative du complément ainsi que celle des réactions inflammatoires, induisent une parodontite sévère. Une étude indique que IgA et les IgG ciblent les parodonto-pathogènes de la cavité buccale dans la salive, le fluide gingival, et empêchent le métabolisme bactérien et l'adhésion des microorganismes aux tissus buccaux [7]. Par ailleurs, les IgA salivaires jouent un rôle important dans la protection contre ces pathogènes, dans les maladies parodontales [14]. Etant donné la complexité de l'éthiopathogénie de la parodontite agressive, notre étude s'intéresse à évaluer la capacité antioxydante totale et les taux IgG, IgA de la salive, chez les patients atteints d'une parodontite agressive comparée aux témoins, et analyser les corrélations entre les paramètres cliniques et ces marqueurs salivaires.

## PATIENTS ET METHODES

## 1. Patients

L'étude est menée sur une population (filles et garçons) jeune atteinte d'une parodontite agressive selon la classification d'Armitage (1999) [15], recrutée au service de parodontologie, département de médecine dentaire, d'Oran (CHUO). Pour ces patients, une fiche de renseignement a été établie. Vingt neuf (29) jeunes patients souffrant de parodontite agressive généralisée ou localisée ont été soumis à un examen parodontal complet par un parodontiste du service.

## 2. Méthodes

## 2.1. Évaluation de l'indice gingival (IG)

Il permet d'évaluer le niveau d'inflammation gingivale et de détecter la présence de saignement au sondage.

- score 0 = absence d'inflammation visible,
- score 1 = inflammation légère sans saignement au sondage,
- score 2 = inflammation modérée avec saignement provoqué,
- score 3 = inflammation sévère avec ulcération.

## 2.2. Sondage parodontal

Pour la détermination de la perte d'attache (PAC) et la profondeur de poche (PPP), chaque dent a été sondée avec une sonde parodontale graduée au niveau de six sites autour (mésio-vestibulaire, vestibulaire, disto-vestibulaire, disto-lingual, lingual et mésio-lingual). Les mesures ont été notées pour chacun des sites.

Vingt cinq sujets jeunes sains et donateurs de salive bénévoles recrutés au même service d'Oran, ne présentant aucune pathologie, sont pris comme témoins, après un examen clinique et un questionnaire à la recherche d'une symptomatologie clinique et de facteurs de risque.

## 2.3. Critères d'exclusion

- Patients présentant une parodontite chronique ;
- Maladies systémiques ;
- Grossesse, alcool, tabac ;
- Patients sous antibiotiques ou anti-inflammatoires 6 mois avant le début de l'étude.

## 2.4. Collection de la salive

La salive non stimulée des patients et des témoins a été prélevée le matin dans des flacons stériles, suivant le protocole de Navazesh [16], puis congelée à -40°C pour les analyses ultérieures. Au moment de la réalisation des analyses, la salive a été décongelée et clarifiée par une étape de centrifugation à 3500 x g pendant 12 minutes.

## 2.5. Mesure de la capacité antioxydante totale

Cette technique est basée principalement sur le protocole Hai-ba et al. [17]. La capacité antioxydante totale (CAT) est détermi-

née par la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) dont le principe est de générer les radicaux libres dans la salive par la réaction de fenton ( $H_2O_2/CuSO_4$ ), et en rapportant le pouvoir antioxydant salivaire à une référence qui est l'acide ascorbique. L'addition de fluorescéine comme sonde fluorescente permet de quantifier, à l'aide d'une analyse spectrofluorométrique en fonction du temps, la perte de fluorescence associée à la réaction avec les radicaux libres fournit par  $H_2O_2/CuSO_4$  par un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène. Les résultats ont été calculés en utilisant les différences de surfaces sous les courbes de décroissance de la fluorescence entre le blanc et un échantillon et exprimés en millimoles d'équivalent d'acide ascorbique par litre.

ORAC = S blanc – S échantillon/S blanc – S antioxydant ;  
Où S : aire sous la courbe cinétique de la fluorescence.

### 2.6. Évaluation des taux en IgG et IgA salivaires

Les contenus en IgG et d'IgA de la salive ont été déterminés par un immuno-néphélomètre, Beckman Coulter, en utilisant des déterminants commercialisés et des contrôles (immunochimie IMMAGE).

### ANALYSE STATISTIQUE

Toutes les données sont analysées par le logiciel version Epi Info 7. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. La comparaison des résultats entre le groupe patients et le groupe témoin est effectuée par l'analyse de la variance (ANOVA). Une différence entre deux moyennes est considérée comme significative lorsqu'elle est associée à une probabilité  $P < 0,05$ .

## RESULTATS

### 1. Effet de la parodontite sur les paramètres cliniques

Cette étude a permis d'évaluer les marqueurs salivaires de 29 jeunes patients atteints de parodontite agressive comparées au groupe témoin de 25 sujets. L'âge moyen des patients est de  $22,39 \pm 4,98$  ans et celui du groupe témoin est de  $24,9 \pm 1,41$ ans. L'analyse des données cliniquement mesurées révèle que la moyenne de la profondeur de poche parodontale (PPP) et la perte d'attache clinique (PAC) du groupe de patients sont respectivement  $7 \pm 1,68$  mm et  $7,81 \pm 1,79$ , la répartition en pourcentage des patients selon la profondeur de la poche parodontale (PPP) et la perte d'attache clinique (PAC) montre que 32% des patients ont une PPP entre 8 et 9mm alors 26% et 24% pour la PAC=8 et 10mm respectivement (figure 1).

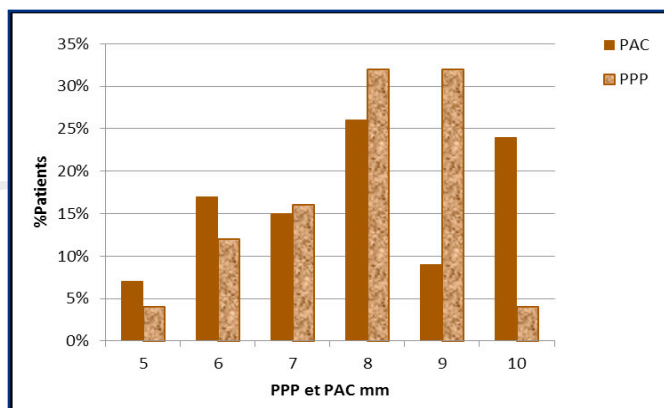


Figure 1. Répartition en pourcentage des patients atteints de parodontite agressive selon la profondeur de la poche parodontale (PPP) et la perte d'attache chimique (PAC).

En outre, la figure 2 montrent que 42% de patients présentent un indice gingival score 3 (figure 2).

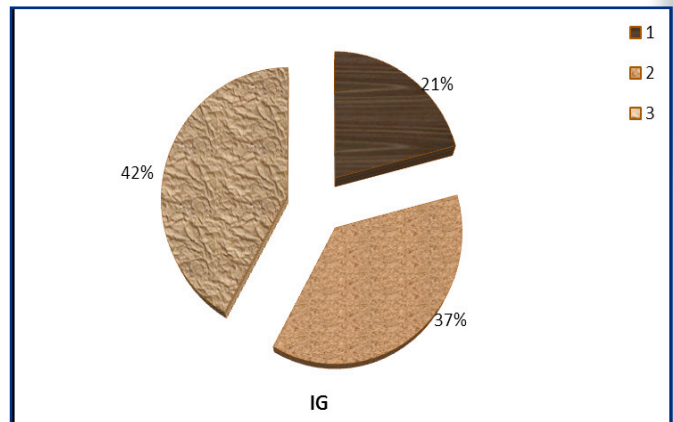


Figure 2. Répartition en pourcentage des patients atteints de parodontite agressive selon le score de l'indice gingival (IG).

### 2. Effet de la parodontite sur la capacité antioxydante totale

Nos résultats indiquent une diminution hautement significative ( $p < 0,001$ ) de 69% de la capacité antioxydante totale (CAT) salivaire chez les patients comparés aux témoins (Figure 3).

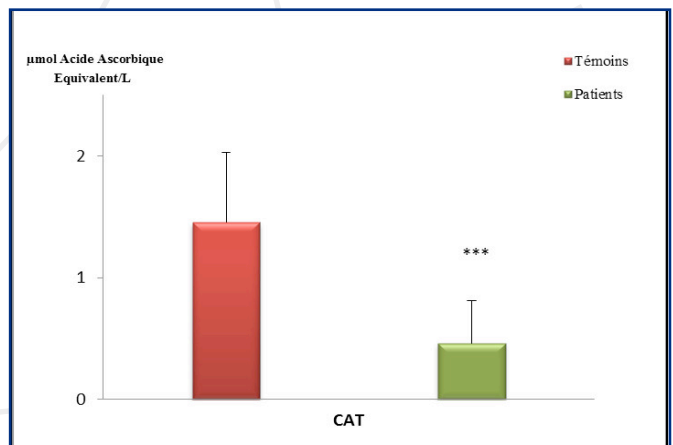


Figure 3. Capacité antioxydante totale (CAT) salivaire chez les patients ayant une parodontite agressive comparés aux témoins. \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3. Effet de la parodontite agressive sur les marqueurs immunologiques

Les taux moyens en IgA chez les patients atteints de parodontite agressive sont significativement ( $P = 0,00041$ ) plus élevés par rapport aux témoins (Figure 4). Les valeurs sont respectivement de  $8,02 \pm 3,68$  contre  $4,67 \pm 1,61$  mg/dl. Par ailleurs, une concentration hautement élevée en IgG ( $P = 0,00000$ ) est constatée chez les patients par rapport aux témoins. Les valeurs sont respectivement de  $8,90 \pm 4,31$  mg/dl par rapport au  $1,46 \pm 0,91$  mg/dl.

### 4. Corrélation entre les paramètres cliniques et CAT, IgG et IgA

Des corrélations négatives ont été notées entre la capacité antioxydante totale (CAT) et la profondeur de la poche parodontale (PPP) et l'indice gingival (IG), alors qu'une corrélation significative positive a été signalée entre la perte d'attache clinique (PAC) ( $P < 0,01$ ) et ce marqueur salivaire.

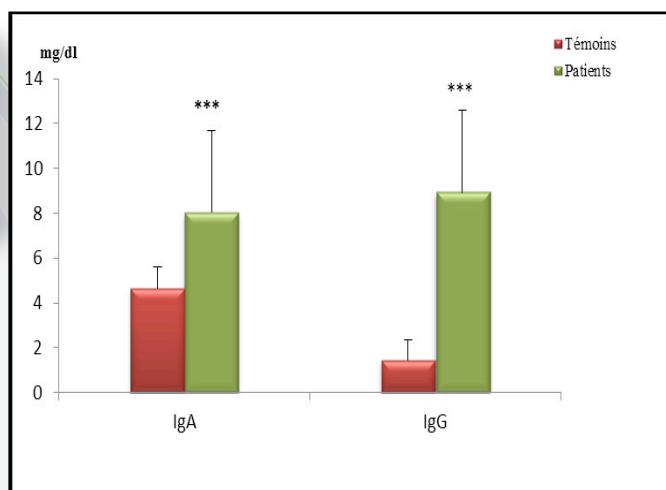


Figure 4. Taux en IgA et IgG salivaires chez les patients ayant une parodontite agressive et chez les témoins.

\*\*\*  $P < 0.001$ .

Nous avons également constaté des corrélations positivement significatives entre les IgG, IgA et les paramètres cliniques : PPP, PAC ( $p < 0.001$ ) et IG ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  (tableau I).

Tableau I. Corrélations entre les marqueurs salivaires et les paramètres cliniques chez les patients ayant une parodontite agressive.

	PPP	PAC	IG
CAT	$r = -0.53NS$	$r = 0.33**$	$r = -0.21NS$
IgG	$r = 0.71***$	$r = 0.65***$	$r = 0.33**$
IgA	$r = 0.47***$	$r = 0.45***$	$r = 0.2*$

\*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ; NS : Non Significant  $P > 0.05$ .

## DISCUSSION

L'objectif de cette étude est de vérifier d'une part, l'hypothèse de l'existence de relations entre la diminution de la capacité antioxydante totale et parodontite, et d'autre part de préciser, les marqueurs immunologiques impliqués dans la progression de cette pathologie.

Nos résultats révèlent que 32% des patients atteints de parodontite se caractérisent par une profondeur de poche de 9 et 8 mm. Par ailleurs, une perte d'attache clinique égale à 8 et 10 mm est observée chez 26% et 24% de patients, respectivement. En outre, 42% des malades représentent une inflammation gingivale sévère avec un indice gingival score 3. L'ensemble de ces données montre que tous nos jeunes patients se caractérisent par la formation d'une poche parodontale profonde, d'une perte d'attache clinique importante 42% et 37% et d'une inflammation gingivale de degré 3,2 respectivement, suggérant la sévérité de la parodontite révélée par une destruction massive et plus ou moins accélérée des tissus parodontaux et pouvant aboutir à la perte prématurée des dents. Nos résultats convergent vers ceux des travaux de Zhang et al. [18].

Cette présente étude démontre que les patients ayant une parodontite agressive ont une atténuation significative de la capacité antioxydante totale au niveau salivaire comparativement aux témoins. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par les travaux antérieurs [10, 18-20]. La réduction des activités antioxydantes de la salive est associée à une augmentation de la production de radicaux oxygénés au cours de l'inflammation parodontale [21]. Un stress oxydatif élevé et une faible capacité antioxydante pourraient jouer un rôle important dans l'étiopathogénie de la parodontite [10, 20, 21]. Par ailleurs, une cor-

rélation significative et positive est observée entre la capacité antioxydante totale et la perte d'attache clinique, ceci pourrait suggérer que la présence de la parodontite chez nos jeunes patients aggrave le stress oxydatif.

L'augmentation du stress oxydatif associé à une diminution de la capacité antioxydante totale semble contribuer à une augmentation de la sévérité de la parodontite. Des constatations similaires sont rapportées par Baltacioglu et al. [7], Vivek Tripathi et al. [22] lors d'une parodontite agressive généralisée et chronique. Les résultats de cette étude démontrent des niveaux salivaires en IgG et IgA significativement plus élevés ( $P < 0,001$ ) chez le groupe ayant une parodontite agressive par rapport au groupe témoin, qui concordent avec l'étude de Srinivasan [23]. Cette augmentation est due probablement à une inflammation qui se caractérise au niveau de l'épithélium de la poche par une fuite accrue du liquide [24].

ou par une augmentation de la synthèse d'IgG et de leur transfert du tissu gingival vers la cavité buccale [23]. Par ailleurs, les cellules B produisent des anticorps dirigés spécifiquement contre les antigènes bactériens, formant ainsi des complexes immuns qui seront détruits par les cellules phagocytaires. La réponse immunitaire contre les pathogènes parodontaux est associée à une production accrue de ROS par les neutrophiles et les macrophages [5].

Les IgA et IgG affectent les microorganismes de la cavité buccale dans la salive. Ces anticorps empêchent le métabolisme bactérien et l'adhésion des microorganismes au tissu buccal [7]. La parodontite agressive est caractérisée par une augmentation des bactéries à Gram négatif dans les poches parodontales. Des travaux ont montré qu'un accroissement de la charge bactérienne est associé à une augmentation des paramètres cliniques chez les patients atteints d'une parodontite [20].

Par ailleurs, cette présente étude indique des corrélations significatives entre les IgG, IgA et tous les paramètres cliniques à l'instar des travaux de Tamaki et al. [20] qui montrent l'existence d'une corrélation très significative entre l'augmentation des bactéries *A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* et *T.denticola* de la salive et la profondeur et la mobilité des poches parodontales. La même étude a constaté que la destruction des tissus parodontaux est principalement due à un désordre de la réponse immunitaire suite à une charge bactérienne accrue [20]. En effet des taux élevés d'IgG dirigées contre *P. gingivalis* et *A. actinomycetemcomitans* sont observés chez les patients atteints de parodontite, entraînant ainsi la destruction du tissu parodontal [25].

## CONCLUSION

La diminution de la capacité antioxydante totale et l'augmentation des IgG et IgA, chez les patients ayant une parodontite agressive, pourrait être probablement la cause de l'altération ou la sensibilité de l'hôte à une inflammation parodontale. Par ailleurs, des corrélations sont notées entre les paramètres cliniques et les marqueurs étudiés, suggérant que ces paramètres pourraient être impliqués dans l'apparition et la progression de la parodontite agressive et semblent être de véritables outils dans le diagnostic de la maladie.

## REFERENCES

- 1- Bouziane D, Makrelouf KL, Bouziane M.  $\beta$ -TCP (R.T.R.) and aggressive periodontitis. Case studies. 2014 Jun; 8 :11-17
- 2- Pellat B. Salives et milieu buccal . EMC Elsevier Masson SAS, Médecine buccale. 2010 Mai ; 1-10.
- 3- Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Jamshidi Z, Kebriyai R.

Evaluation of Salivary and Serum Antioxidant and Oxidative Stress Statuses in Patients with Chronic Periodontitis: A Case-Control Study. *Front Physiol.* 2017 Mar; 8:189.

**4 - Canakçi CF, Çiçek Y, Canakçi V.** Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases, *Biochemistry.* 2005 Jun;70: 619-28.

**5- Mark I.** Ryder Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010 Jun;53: 124-37.

**6- Chapple IL, Matthews JB.** The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000.* 2007 Jan; 43: 160–232.

**7- Baltacıoğlu E, Yuva G, Aydın P.** Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *Journal of Periodontology.* 2014 Oct; 10: 1432-41.

**8-Canakci CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci.** Increased level of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur J Dent.* 2009 Apr; 3: 100–6.

**9- Žilinskas J, Kubilius R, Žekonis G, and Žekonis J.** Total antioxidant capacity of venous blood, blood plasma, and serum of patients with periodontitis, and the effect of Traumeel S on these characteristics. *Medicina(Kaunas).* 2011; 47: 193-9.

**10- Baser U, Gamsiz-Isik H, Cifcibasi E, Ademoglu E, Yalcin F.** Plasma and salivary total antioxidant capacity in healthy controls compared with aggressive and chronic periodontitis patients. *Med J.* 2015 Jul; 36: 856-61.

**11- Socransky S.S, Haffajee A.D, Cugini M.A, Smith C, Kent R.L.Jr.** Microbial complexes in sub gingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 1998; 25: 134–144.

**12- Makhrelouf L.K.** Les facteurs génétiques et bactériens dans la genèse des parodontites agressives. Thèse de Doctorat en sciences médicales université d'Oran ; 2009.

**13- Yacoubi A, Bouziane D, Makhrelouf L, Bensoltane A.** Microbiological Study of Periodontitis in the West of Algeria. *World Journal of Medical Sciences.* 2010; 5: 07-12.

**14- Branco-de-Almeida LS, Alves CM, Lopes FF, Pereira Ade F, Guerra RN, Pereira AL.** Salivary IgA and periodontal treatment needs in diabetic patients. *Braz Oral Res.* 2011 Nov-Dec; 25: 550–5.

**15- Armitage G.C.** Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology.* 1999; 4: 1-6.

**16- Navazesh M.** Methods for collecting saliva. *Ann. NY. Acad Sci.* 2006 ;694:72-7.

**17-Haiba F, Kerboua K, Ait Hami N, Benmahdi L.** Stress oxydatif et infertilité masculine : premiers résultats de l'expérience algérienne pilote à l'HMRUO/2°RM. *Revue Médicale de l'HMRUO.* 2014. No1-2014 :3-4.

**18- Zhang T, Andrukhov O, Haririan H, Kern M M, Liu S, Liu Z and Rausch-Fan X.** Total Antioxidant Capacity and Total Oxidant Status in Saliva of Periodontitis Patients in Relation to Bacterial Load. 2016 Jan 6; 5: 97.

**19- Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM, Pastor S, Serrano F, Puig-Silla M, Das F.** Oxidative stress parameters in saliva and its association with periodontal disease and types of bacteria. *Dis. Markers* 2015;6535-37.

**20- Tamaki N, Yoshino F, Fukui M, Hayashida H, Yoshida A, Kitamura M et al.** Relationship among salivary antioxidant activity, cytokines, and periodontitis: the Nagasaki Island study. *J. Clin. Periodontol.* 2015 Aug; 42: 711-18.

**21- Trivedi S, Lal N, Mahdi AA, Singh B, and Pandey S.** Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes, and chronic periodontitis. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 2015 Mar-Apr; 35: 14-9.

**22- Tripathi V, Singh ST, Sharma V, Verma A, Singh CD, Gill JS.** Assessment of Lipid Peroxidation Levels and Total Antioxidant Status in Chronic and Aggressive Periodontitis Patients: An in vivo Study. *The Journal of Contemporary Dental Practice.* March 2018; 19: 1-5.

**23- Srinivasan PC.** Immunoglobulin Levels and Periodontal Diseases- *Clinical Immunological Study.* 2012 Jan; 1: 254.

**24- Reiff RL.** Serum and salivary IgG and IgA response to initial preparation therapy. *J Periodontol.* 1984 May; 55: 299-305.

**25- Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Hammond BF, and Frey DE.** Human immune responses to oral microorganisms. II. Serum antibody responses to antigens from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the correlation with localized juvenile periodontitis. *J. Clin. Immunol.* 1983 Oct; 3: 321-31.