

UNIVERSITÉ DE LILLE

École Doctorale Biologie et Santé de Lille

UMR 1008 « Médicaments et Biomatériaux à Libération Contrôlée :
Mécanismes et Optimisation »

UMR 1109 « Nanomédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire »

THÈSE

Par : **Thibault BÉCAVIN**

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2015

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Lille

Spécialité : 58 – 5801 – odontologie conservatrice, endodontie

Développement d'implants actifs et nanostructurés à des fins de régénération dentaire

Directeurs de Thèse

M. le Professeur Etienne Deveaux

PU-PH, Université de Lille, UMR 1008

Mme le Docteur Sabine Kuchler-Bopp

Chargée de recherche, Université de Strasbourg, UMR 1109

Rapporteurs Externes

M. le Professeur Etienne Médioni

PU-PH, Université de Nice Sophia Antipolis, URE 01 UNS

M. le Professeur Jean-Christophe Maurin

PU-PH, Université de Lyon, UMR CNRS 5615

Membre Invité

Mme le Docteur Nadia Benkirane-Jessel

Directrice de recherche, Université de Strasbourg, UMR 1109

Résumé

L'ingénierie tissulaire a vu émerger, dans la dernière décennie, la nanomédecine régénérative combinant non seulement les cellules souches mais aussi les facteurs de croissance. Le but de ce travail a été d'utiliser les techniques de l'ingénierie osseuse et pulpaire pour améliorer ou créer des implants actifs et vivants. L'ingénierie tissulaire vise à remplacer ou à réparer des tissus endommagés de l'organisme par des implants bioactifs imitant les tissus naturels. Ainsi, il est nécessaire de développer en premier lieu des matériaux biocompatibles, c'est-à-dire acceptés par l'organisme, et capables d'interagir avec les cellules au site de l'implantation du dit matériau afin d'aider à la fonction de l'implant. Pour cette raison, de nombreuses méthodes visent le développement de biomatériaux implantables imitant le mieux possible la matrice extracellulaire. Dans cette étude, l'"électrospinning" a été utilisé afin de concevoir des membranes nanofibreuses. Elles ont ensuite été fonctionnalisées et associées à des germes de 1^{re} molaire mandibulaire de souris afin d'en favoriser le développement. Après une revue de littérature s'intéressant à l'ingénierie tissulaire en chirurgie dentaire, deux axes de recherche seront développés. Le premier concerne la régénération de l'unité os/dent et le deuxième l'innervation de la dent.

Abstract

In the last decade, regenerative nanomedicine emerged from tissue engineering by combining stem cells and growth factors. The aim of this work was to use the bone and dental pulp tissue engineering technics to improve or create new living and active implants. Tissue engineering aims to replace or repair damaged tissues with bioactive implants mimicking natural tissue. Thus, it is necessary to develop in a first place, new biocompatible materials. These materials should be well accepted by the organism and capable to interact with the cells present in the implantation site to help the implant integration. In this study, Electrospinning was used to create nanofibrous membrane which size and organization are comparable to the extracellular matrix. These membranes were functionalized and associated with first molar embryological germs to promote their development. After a literature review about tissue engineering in dental surgery, two research thematics will be developed. The first thematic is to regenerate the bone/tooth unit and the second is to innervate the tooth.

Mots clés : Nanomédecine régénérative, biomatériaux nanostructurés, facteurs de croissance, fonctionnalisation, régénération dentaire

Keywords: Regenerative nanomedicine, nanostructured biomaterials, growth factors, functionalization, tooth regeneration

Remerciements

Aux membres du Jury :

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et je vous en remercie.

Pr Jean-Christophe Maurin, vous avez présidé mes comités de suivi de thèse au cours des trois dernières années et avez donc pu observer l'évolution de ce travail. Je vous remercie pour le temps que vous y avez consacré et pour vos précieux conseils. J'espère avoir atteint les objectifs fixés. Je vous remercie également pour les échanges que nous avons pu avoir lors des différents congrès auxquels nous nous sommes rencontrés. Je vous estime beaucoup et j'espère que nous pourrons élaborer des projets communs dans le futur.

Pr Étienne Médioni, je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse en tant que rapporteur. Vous côtoyer lors de ma formation post-universitaire a été une grande source d'inspiration. J'ai pu apprécier votre sens de la pédagogie et vos grandes qualités cliniques. J'espère que nous aurons encore l'occasion de nous rencontrer et de travailler ensemble.

Dr Sabine Kuchler-Bopp, Sabine, merci pour tout ! Sans toi, cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Merci de m'avoir formé. Merci de m'avoir aidé. La passion qui t'habite est admirable et a été une grande source de motivation. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble sur de futurs projets entre Lille et Strasbourg.

Pr Étienne Deveaux, cher Doyen, cher Étienne. Tu m'as connu en tant qu'étudiant, puis en temps que confrère et enfin en tant que collègue. Tu es un exemple pour moi et c'est un honneur de travailler à tes côtés. Merci de m'avoir aidé et soutenu sur la route semée d'embûches qui mènent à l'enseignement en Chirurgie Dentaire. Vois dans l'accomplissement de ce travail l'expression de mon plus profond respect.

Dr Nadia Benkirane-Jessel, Nadia, merci de m'avoir accepté dans ton laboratoire. Tu m'as accueilli les bras ouverts et je t'en remercie. Tu as de même accepté

de me codiriger la première année. Sans toi cette thèse n'aurait jamais vu le jour. J'espère que de futures collaborations pourront voir le jour entre Lille et Strasbourg.

Aux membres de l'équipe 1109 :

Je remercie tous les membres de l'équipe 1109 pour le temps passé en leur compagnie.

Tunay, merci l'ami. Merci pour tes précieux conseils, ta gentillesse, ta bonne humeur.

David, merci pour nos longues discussions et pour les moments passés ensemble. A bientôt sur Lille j'espère !

Stéphanie, merci d'avoir apporté un peu de Picardie !

Arielle, merci pour ta gentillesse et le café !

Hervé, merci pour tes magnifiques histologies.

Florence, merci pour tes conseils.

Pierre, merci pour la nourriture !

Merci à Laetitia, Alice, Jessica, M. Fluck, M. Lesot, Olivier, Jean-Luc, René, François. Cela a été un plaisir de vous côtoyer.

Aux membres de l'équipe 1008 :

Je remercie tous les membres de l'équipe 1008 pour leur aide.

Pr Juergen Siepmann, merci pour votre humour et votre gentillesse.

Dr Nicolas Blanchemain, merci pour vos conseils lors des comités de suivi de thèse. J'espère que nous pourrions continuer à travailler ensemble sur de futurs projets.

Dr Feng Chai, merci pour votre gentillesse et vos conseils.

À mes proches et collègues :

Pour terminer, je souhaiterais remercier tous mes proches et collègues pour toute l'aide et le soutien qu'ils m'ont apportés.

Je remercie particulièrement ma compagne de toujours, Sandy. Ca-y-est ! Les études sont terminées ! On s'était dit qu'elles passaient avant le reste mais cela a pris plus de temps que prévu ! Ces douze années passées à tes côtés, de près ou de loin, n'ont été que du bonheur. Merci de m'avoir soutenu dans ce projet, merci d'avoir été là. Je pense que nous nous rappellerons longtemps de l'année 2015. Que la force soit avec nous jusqu'au bout !

Je remercie mes parents pour leur soutien inconditionnel. Papa, merci de m'avoir permis de me détendre lors de nos nombreux week-ends "glandouille et bière". Maman, merci pour tout et surtout pour les currywurst !

Je remercie ma sœur, Alyssa, pour tout et surtout pour la disparition de mon mal au dos ! You rock !

Merci à Lieven et Marion, mes parents adoptifs et mes compagnons de "lutte". Merci pour le canapé. Sans vous, cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Merci pour votre soutien.

Merci à mes collègues, Alain, Marc, Pierre, Dominique, Laurent, Claire, Aurélie, Henry, Maxime, FX, Marie, Amélie, Thomas, Nico, Jérôme, Nicolas, Emmanuelle, Claude, et tous les autres mais la liste serait trop longue. C'est toujours un plaisir d'aller au boulot avec des gens géniaux !

Merci à la SNCF. Recevoir ma carte de Grand Voyageur Plus Le club a été un grand honneur.

*Que la force me soit donné de supporter ce qui ne peut être changé
et le courage de changer ce qui peut l'être
mais aussi la sagesse de distinguer l'un de l'autre*

Marc Aurèle,

Liste des publications :

- Bécavin T, Eap S, Kökten T, Keller L, Fioretti F, Weickert J-L, Deveaux E, Benkirane-Jessel N and Kuchler-Bopp S. Nanofibers implant functionalized by NGF as new strategy to innervate bioengineered tooth. Advanced Healthcare Materials. 2013
- Kuchler-Bopp S, Bécavin T, Kökten T, Fioretti F, Deveaux E, Benkirane-Jessel N, and Keller L. Nanostructured hybrid materials for bone-tooth unit regeneration. Open Journal of Regenerative Medicine, 2013, 2:47-52.
- Kökten T, Bécavin T, Keller L, Weickert J-L, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. Plos One, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0086011

Listes des communications :

- Bécavin T, Lunardi D, Deveaux E, Colard T, Age estimation after pulp/dental hard tissues ratios determination in molars by micro-CT scan. Congrès de l'European Federation of Conservative Dentistry (CONSEURO) (Paris), 2013
- Benkirane-Jessel N, Eap S, Ferrand A, Keller L, Schiavi J, Lemoine S, Bécavin T, Fioretti F. Smart nanostructured implants for regenerative nanomedicine. Journal of Material Science and Engineering. 2013, 2:4. 2nd International Conference and Exhibition on Materials Science and engineering, October 07-09, 2013 Hampton Inn Tropicana, Las Vegas, NV, USA
- Bécavin T, Lunardi D, Deveaux E, Colard T, Modalités de l'apposition de dentine secondaire au cours de la vie, application à l'estimation de l'âge au décès. Collège National des Enseignants en Odontologie Conservatrice (CNEOC) (Strasbourg), 2012
- Bécavin T, Eap S, Keller L, Kökten T, Fioretti F, Weickert J-L, Deveaux E, Benkirane-Jessel N, and Kuchler-Bopp S, Living nanofibers implant functionalized by NGF as new strategy to innervate bioengineered tooth. Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS) (Strasbourg), 2013
- Fioretti F, Bécavin T, Lemoine S, Richert L, Benkirane-Jessel N, Nanostructured assemblies for dental pulp regeneration. Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS) (Strasbourg), 2013
- Bécavin T, Eap S, Keller L, Kökten T, Fioretti F, Weickert J-L, Deveaux E, Benkirane-Jessel N, and Kuchler-Bopp S, Living nanofibers implant functionalized by NGF as new strategy to innervate bioengineered tooth. Forum des jeunes chercheurs en odontologie, Collège National des Enseignants en Sciences Biologiques Odontologiques (CNESBO) (Strasbourg), 2013

- Bécavin T, Kokten T, Clauss F, Bahi S, Benkirane-Jessel N, Fioretti F, Un nano-assemblage pour initier la régénération endodontique. Forum des jeunes chercheurs en odontologie, Collège National des Enseignants en Sciences Biologiques Odontologiques (CNESBO) (Strasbourg), 2013
- Kuchler-Bopp S, Bécavin T, Kökten T, Fioretti F, Deveaux N, Benkirane-Jessel N and Keller L, Utilisation de matériaux nanostructurés pour la régénération de l'unité os/dent, Collège National des Enseignants en Odontologie Conservatrice (CNEOC) (Lille), 2014
- Kuchler-Bopp S, Bécavin T, Kökten T, Fioretti T, Deveaux E, Benkirane-Jessel N and Keller N, Utilisation de matériaux nanostructurés pour la régénération de l'unité os/dent, Journée André Verbert (Lille), 2014
- Bécavin T, Kuchler-Bopp S et Deveaux E, Culture de micro-organes en 3D : un modèle expérimental pour la culture d'organes dentaires, Collège National des Enseignants en Odontologie Conservatrice (CNEOC) (Toulouse), 2015
- Bécavin T, Kuchler-Bopp S, Deveaux E et Benkirane-Jessel N, Culture de micro-organes en 3D : un modèle expérimental pour la culture d'organes dentaires, Forum des jeunes chercheurs en odontologie (Lille), 2015

Prix scientifiques :

- Prix du Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, Collège National des Enseignants en Sciences Biologiques Odontologiques (CNESBO) 2013 – Strasbourg
- Prix de la plus belle photo scientifique, Journée André Verbert, 2014 – Lille
- Prix du Collège National des Enseignants en Odontologie Conservatrice, CNEOC, 2015 – Toulouse
- Prix du Forum des Jeunes Chercheurs en Odontologie, Collège National des Enseignants en Sciences Biologiques Odontologiques (CNESBO) 2015 – Lille

Tables des matières

Tables des matières	10
Listes des abréviations	15
I. Introduction	17
II. Revue de la littérature	20
2.1 Apport de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative en chirurgie dentaire	21
2.1.1 Le coiffage pulpaire direct.....	21
2.1.1.1 L'hydroxyde de calcium (OH ₂ Ca)	22
2.1.1.2 Ciments silicate de calcium.....	24
2.1.2 La revascularisation.....	26
2.1.3 La régénération osseuse ou tissulaire guidée (ROG ou RTG)	28
2.2 L'ingénierie tissulaire de l'organe dentaire	33
2.2.1 Cellules souches d'origine humaine utilisées dans l'ingénierie de l'organe dentaire.....	34
2.2.1.1 Cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs)	35
2.2.1.2 Cellules souches pulpaires des dents lactéales (SHEDs)	35
2.2.1.3 Cellules souches du ligament parodontal (PDLSCs)	36
2.2.1.4 Cellules souches de la papille apicale (SCAPs)	37
2.2.1.5 Cellules souches du follicule dentaire	37
2.2.2 Le modèle de la souris.....	38
2.2.2.1 Le germe de 1 ^{re} molaire mandibulaire de souris.....	38
2.2.2.2 Les réassociations épithélio-mésenchymateuses.....	39
2.2.3 Les biomatériaux utilisés en ingénierie de l'organe dentaire et leurs méthodes de fabrication	41
2.2.3.1 Les polymères d'origine naturelle	42
2.2.3.1.1 Le collagène	42
2.2.3.1.2 Le chitosan	43
2.2.3.1.3 La soie	44
2.2.3.1.4 L'alginate	45
2.2.3.1.5 L'acide hyaluronique.....	47

2.2.3.1.6 Les peptides/protéines	48
2.2.3.2 Les polymères synthétiques	48
2.2.3.2.1 Le poly (ethylene glycol) (PEG).....	48
2.2.3.2.2 L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA).....	49
2.2.3.2.3 Le polycaprolactone (PCL)	49
2.2.3.3 Les céramiques.....	50
2.3 Mise en œuvre d'une membrane originale	52
2.3.1 L'électrospinning.....	52
2.3.2 La technique des multicouches de polyélectrolytes (LBL)	54
III. Objectifs du travail	56
IV. Matériel et méthodes	59
4.1 Préparation, fonctionnalisation et caractérisation des membranes.....	60
4.1.1 Production des membranes par électrospinning	60
4.1.1.1 Préparation de la solution de polymère.....	60
4.1.1.2 Mise en œuvre de l'électrospinning	60
4.1.2 Fonctionnalisation des membranes par la méthode des multicouches de polyélectrolytes.....	62
4.1.2.1 Préparation des membranes.....	62
4.1.2.2 Préparation des solutions	62
4.1.2.3 Préparation des nanoréservoirs	63
4.1.3 Caractérisation des membranes au microscope électronique à balayage (MEB)	63
4.1.3.1 Préparation des échantillons.....	63
4.1.3.2 Observation au MEB.....	64
4.2 Cultures cellulaires et d'organes	65
4.2.1 Les germes de 1 ^{re} molaire mandibulaire de souris.....	65
4.2.1.1 Prélèvement des germes	65
4.2.1.2 Culture des germes.....	65
4.2.2 Culture d'ostéoblastes primaires de souris.....	66

4.2.2.1 Origine des cellules.....	66
4.2.2.2 Culture des ostéoblastes.....	66
4.2.3 Prélèvement des ganglions trijumeaux (TG)	67
4.3 Caractérisation <i>in vitro</i>	68
4.3.1 Culture des ostéoblastes	68
4.3.1.1 Étude de l'expression des protéines osseuses	68
4.3.1.2 Étude de la minéralisation.....	70
4.4 Caractérisation <i>in vivo</i>	70
4.4.1 Préparation des échantillons	70
4.4.1.1 Stérilisation des membranes.....	70
4.4.1.2 Implant pour la régénération d'une unité os/dent.....	71
4.4.1.2.1 Préparation du collagène.....	71
4.4.1.2.1 Préparation des implants.....	71
4.4.1.3 Implant pour l'innervation de l'organe dentaire	71
4.4.2 Expérimentation animale chez la souris ICR.....	72
4.4.2.1 Implantations.....	72
4.4.2.2 Explantations	73
4.4.3 Histologie.....	74
4.4.4 Immunofluorescence	74
V. Résultats et discussion.....	75
5.1 Développement d'implants hybrides nanostructurés pour la régénération de l'unité os/dent	76
5.1.1 Contexte et objectifs	76
5.1.2 Résultats et discussion.....	77
5.1.3 Conclusion.....	80
5.2 Développement d'implants nanofibreux et fonctionnalisés pour l'innervation de l'organe dentaire.....	81
5.2.1 Contexte et objectifs	81
5.2.2 Résultats et discussion.....	82

5.2.3 Conclusion	86
VI. Conclusion générale et perspectives.....	88
VII. Annexes	91
ANNEXE N°1 : Réassociations épithélio-mésenchymateuses de poumons, reins et glandes salivaires.....	92
ANNEXE N°2 : Réassociations épithélio-mésenchymateuses d'organes dentaires	117
ANNEXE N°3 : Stimulation de l'innervation de la dent grâce à l'immunomodulation	122
VIII. Références	123
Listes des figures	136
Listes des tableaux	138

Listes des abréviations

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Brain derived neurotrophic factor)

BMP : protéine morphogénique osseuse (bone morphogenetic protein)

BSA : albumine de sérum bovin (bovin serum albumine)

CAO : cariée, obturée, absente

Coll IV : collagène de type IV

DAPI : 4',6' – diamidino – phénylindole

DCM : dichlorométhane

DGL-G4 : dendrigraft de lysine de génération 4

DMEM : milieu Eagle modifié de Dubelcco (Dubelcco's modified eagle medium)

DMF : diméthylformamide

DPC : cellule de la pulpe dentaire (dental pulp cell)

DPSC : cellule souche de la pulpe dentaire (dental pulp stem cell)

FBS : Serum foetal bovin (fetal bovine serum)

FDA : US Food and Drug Administration

GDNF : facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (glial cell derived neurotrophic factor)

GFP : protéine fluorescente verte (green fluorescent protein)

HA : hydroxyapatite

HMDS : hexaméthylidisilazane

HUVEC : cellule endothéliale de la veine du cordon ombilical humain (human umbilical vein endothelial cell)

ICR : Imprinting Control Region

iPS : cellule souche pluripotente induite (induced pluripotent stem cell)

JE : jour embryonnaire

JEM : jonction épithélio-mésenchymateuse

LBL : couche par couche (layer-by-layer)

MEB : microscopie électronique à balayage

MEC : matrice extra-cellulaire

MES : acide 2-(N-morpholino)-ethane-sulfonique

MET : microscopie électronique à transmission

MTA : mineral trioxide aggregate

NGF : facteur de croissance des nerfs (nerve growth factor)

OCT : optimum cutting temperature

OH₂CA : hydroxyde de calcium

PAA : acide polyacrylique

PBS : tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)

PDLC : cellule du ligament périodontaire (periodontal ligament cell)

PDLSC : cellule souche du ligament périodontaire (periodontal ligament stem cells)

PCL : polycaprolactone

PDLLA : acide poly(D, L – lactique)

PE : polyéthylène

PEG : polyéthylène glycol

PFA : paraformaldéhyde

PGA : acide polyglycolique

PLGA : poly(lactic-co-glycolic acid)

PLL : poly(L – lysine)

PLLA : acide poly(L – lactique)

PSM : poste de sécurité microbiologique

RGD : arginine – glycine – acide aspartique

ROG/RTG : régénération osseuse/tissulaire guidée

SCAP : cellule souche de la papille apicale (stem cell from apical papilla)

SHED : cellule souche des dents lactéales (Stem cell from human exfoliated deciduous teeth)

TCP : tri – calcium phosphate

TGF – β : Facteur de croissance de transformation β (transforming growth factor β)

I. Introduction

La chirurgie dentaire s'attache à la prise en charge de patients porteurs de pathologies bucco-dentaires. Il est cependant réducteur de ne considérer que son volet interventionniste et chirurgical. La prévention joue en effet un rôle déterminant dans la pratique quotidienne de tout chirurgien dentiste. C'est en limitant l'apparition de lésions initiales ou en les interceptant le plus rapidement possible que l'amélioration de la santé bucco-dentaire des populations sera optimale. Bien que l'indice CAO (dents cariées, absentes ou obturées), qui recense les dents cariées, absentes ou obturées (soignées), soit en nette diminution au niveau mondial, la carie dentaire est toujours considérée comme le 3^e fléau mondial par l'OMS. Elle toucherait 5 milliards de personnes sur terre et ceci notamment dans les pays développés où 60 % à 90 % des enfants seraient touchés. Toujours selon l'OMS, les maladies parodontales toucheraient 5 à 15 % des populations. Ces maladies sont évitables et contrôlables en appliquant des règles simples d'hygiène bucco-dentaire. Il reste cependant toujours nécessaire de mettre en place des traitements chirurgicaux lorsque le cadre de la prévention est dépassé.

Les soins en chirurgie dentaire sont répartis en plusieurs catégories :

- les soins conservateurs qui s'appliquent aux traitements des lésions carieuses à l'aide de différents biomatériaux,
- les soins endodontiques qui s'appliquent lorsque la vitalité pulpaire est compromise,
- les soins parodontaux qui traitent les pathologies liées aux différents tissus constituant le parodonte,
- les soins prothétiques qui permettent de remplacer les pertes de substances dentaires importantes ou de traiter l'absence d'organe dentaire
- les soins chirurgicaux qui s'intéressent aux différentes pathologies orales.

Pour simplifier à l'extrême, les soins dentaires interventionnistes se contentent actuellement de réaliser l'éviction d'un tissu endommagé et de remplacer la perte de substance par un biomatériau non actif. Cette simplification est nécessaire pour mieux appréhender l'évolution de la chirurgie dentaire qui est en train de se mettre en place. Pourquoi retirer un tissu endommagé s'il peut être régénéré ? Pourquoi retirer une pulpe dentaire inflammatoire (biopulpectomie) si cette inflammation peut être

contrôlée et ainsi maintenir la vitalité de l'organe dentaire ? La réponse à ces questions est à chercher dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative.

L'ingénierie tissulaire vise à remplacer ou à réparer un organe ou un tissu à l'aide de biomatériaux actifs ou non afin de rétablir la perte d'une fonction biologique. Cette science s'applique aujourd'hui à de nombreux domaines de la médecine et nous verrons par la suite que certaines applications ont été trouvées en chirurgie dentaire. La médecine régénérative, quant à elle, vise plutôt à favoriser la régénération d'un organe ou d'un tissu en activant les cellules de l'hôte grâce ou non à des biomatériaux. Ces derniers servent le plus souvent de support à des cellules et peuvent être fonctionnalisés. Dans les deux cas, les techniques employées sont fonction du but recherché et de l'organe cible.

Ce travail, s'est intéressé au développement d'implants nanostructurés et fonctionnalisés à des fins de régénération dentaire et à la mise au point d'un nouveau modèle expérimental de réassociations cellulaires permettant le développement d'un organe dentaire chez la souris. Le modèle utilisé est celui du germe embryonnaire de souris. Ce modèle est souvent employé dans ce cadre car les différentes étapes du développement de la dent chez la souris sont très comparables à ce qui est retrouvé chez l'être humain. Après une revue de littérature concernant l'ingénierie tissulaire en chirurgie dentaire, c'est plus particulièrement le développement d'une unité os/dent et l'innervation de germes dentaires de souris qui seront détaillés dans ce travail.

II. Revue de la littérature

2.1 Apport de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative en chirurgie dentaire

En parallèle des techniques classiques de traitements en chirurgie dentaire, les praticiens ont utilisé, depuis les années 1950, des techniques de coiffage pulpaire direct induisant des processus biologiques de cicatrisation tissulaire pouvant se rapprocher de l'ingénierie tissulaire . Cependant, ils n'avaient pas conscience à l'époque d'être des pionniers dans le domaine. Aujourd'hui, ces processus sont mieux connus et de nouveaux matériaux sont apparus sur le marché. La mise au point de membranes et de substituts osseux a permis l'essor de l'ingénierie tissulaire en dentaire. Dans ce chapitre, les principales thérapeutiques en chirurgie dentaire qui font appel à ces techniques vont être détaillées.

2.1.1 Le coiffage pulpaire direct

Le coiffage pulpaire direct est une technique visant à recouvrir une partie de la pulpe dentaire qui a été exposée au milieu extérieur à l'aide d'un biomatériau actif. Le but est de maintenir la vitalité pulpaire. La pulpe peut-être exposée dans deux cas : suite à un curetage carieux profond ou suite à un traumatisme qui a entraîné une fracture dentaire.

Si une lésion carieuse n'est pas dépistée et traitée à temps, elle peut mettre en péril le maintien de la vitalité pulpaire. En effet, la diffusion des produits de dégradation tissulaire et des toxines bactériennes va entraîner l'apparition d'une inflammation pulpaire appelée pulpite (1–3). Celle-ci peut-être qualifiée de réversible ou d'irréversible en fonction des signes cliniques (4).

La pulpite irréversible est caractérisée par des douleurs aiguës, spontanées, pulsatiles et augmentées au froid (5). Le traitement actuel consiste en une ablation de la pulpe dentaire inflammatoire par différents procédés mécaniques et chimiques. Le système canalaire doit ensuite être obturé de façon hermétique afin de prévenir une éventuelle infection. Ce traitement chirurgical s'appelle "la biopulpectomie". Sans

la pulpe dentaire, la dent ne peut plus répondre aux agressions extérieures et s'en retrouve fragilisée. Il sera vu dans un autre chapitre (2.1.2) que certains auteurs proposent une technique permettant de retrouver dans certains cas un tissu vivant dans le système canalaire.

Dans le cadre d'une pulpite réversible, les douleurs sont provoquées et cessent après le stimulus (6). Le traitement classique consiste à réaliser le curetage de la lésion carieuse et à réaliser une reconstitution coronaire à l'aide d'un biomatériau non-actif. Cependant, durant la procédure chirurgicale, une effraction pulpaire peut être réalisée. Auparavant, le traitement était la biopulpectomie car le chirurgien dentiste ne disposait pas de biomatériaux susceptibles de maintenir la vitalité pulpaire après l'atteinte de ce tissu. Le but de ce coiffage est d'induire la production de dentine réparatrice en regard de la lésion et donc d'autoriser la cicatrisation pulpaire (7). Celle-ci suit toujours les mêmes étapes : hémostase, inflammation, prolifération cellulaire et différenciation (8). Ce processus nécessite le recrutement de nouvelles cellules progénitrices (cellules souches pulpaires) qui vont remplacer les odontoblastes détruits en se différenciant (9).

Aujourd'hui, différents biomatériaux ont les propriétés adéquates à la réalisation d'un coiffage pulpaire direct. Ceux qui sont le plus couramment utilisés vont être détaillés : l'hydroxyde de calcium et les ciments silicate de calcium.

2.1.1.1 L'hydroxyde de calcium (OH_2Ca)

L'hydroxyde de calcium est utilisé depuis les années 1950 comme matériau de coiffage pulpaire (10, 11). Il se présente sous la forme d'une poudre à mélanger avec de l'eau avant son utilisation. Des préparations commerciales en seringues existent afin de faciliter son utilisation. Il possède les propriétés suivantes :

- activité antiseptique due à son alcalinité ($\text{pH}=12,5$) (12),
- activité hémostatique et anti-inflammatoire (13),
- induction de la réparation pulpaire par agression localisée (14,15).

Le taux de succès est très variable en fonction des études et peut varier avec le temps entre 80 % à un an et 59 % à neuf ans (16, 17). Le succès peut aussi être variable en fonction de la dent traitée avec un taux de réussite meilleur sur les incisives centrales (80 %) que sur les troisièmes molaires mandibulaires (38 %) (18). De plus, le pont dentinaire qu'il permet d'obtenir peut être poreux et donc peu étanche, ce qui peut favoriser une contamination pulpaire secondaire au traitement (19). Sa forte alcalinité entraîne une nécrose superficielle de la pulpe qui est néfaste à la cicatrisation pulpaire (20, 21) (Figure 1). Cependant, cette cicatrisation est longue à se mettre en place. Les processus mis en jeu ont été décrits par de nombreux auteurs (22–25). Une revue de la littérature a été réalisée par Olsson en 2006 sur les matériaux de coiffages pulpaire (26). Il en ressort que le pont dentinaire met 2 à 3 mois à se former grâce à l'hydroxyde de calcium. Ce délai, couplé à la non adhérence de l'hydroxyde de calcium aux tissus dentaires, peut expliquer le taux de succès relativement faible de cette thérapeutique.

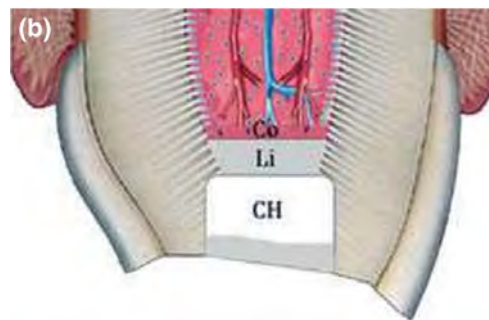


Figure 1 : Représentation schématique d'une biopulpotomie avec pose d'un hydroxyde de calcium. CH=hydroxyde de calcium, Li=zone de nécrose superficielle, Co=zone de coagulation (26).

Longtemps considéré comme le matériau de référence pour la réalisation des coiffages pulpaire directs, l'hydroxyde de calcium est de moins en moins utilisé dans cette optique depuis la disponibilité sur le marché d'une nouvelle famille de matériau : les ciments silicate de calcium.

2.1.1.2 Ciments silicate de calcium

Les ciments silicate de calcium sont apparus pour un usage dentaire en 1993 avec la mise sur le marché du Mineral Trioxide Aggregate (MTA). Ce matériau est dérivé du ciment de Portland dans lequel a été rajouté de l'oxyde de bismuth pour le rendre radio opaque. Le MTA est biocompatible, bioactif et permet l'obtention d'une herméticité complète au niveau du joint matériau/tissus dentaires (27–29). En effet, en contact direct avec le tissu pulpaire, il va induire la formation d'un pont dentinaire étanche et adhérent aux bords de la lésion (30) (Figure 2).

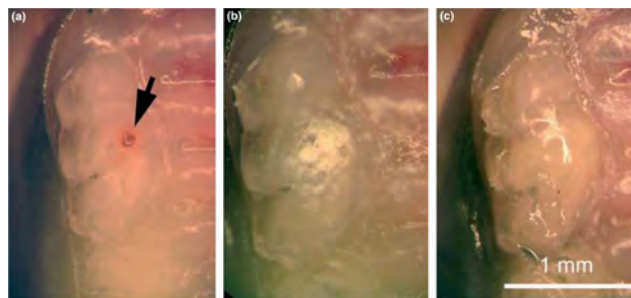


Figure 2 : Photographie d'une exposition pulpaire (a), de la pose d'un MTA (b) et d'un composite (c) chez la souris. (30)

Ce matériau est en concurrence directe avec l'hydroxyde de calcium pour le coiffage pulpaire. Cela a poussé de nombreux auteurs à comparer leur efficacité (20). Le MTA aurait une action directe sur la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire (31–33). Une barrière minérale se forme rapidement à son contact et de la dentine néoformée a pu être observée après seulement 3 semaines (34). De plus, son excellente herméticité va inhiber la pénétration bactérienne dans la lésion pulpaire (35, 36). Sur des dents immatures, le MTA a montré d'excellents résultats (100 % de réussite) pour des traitements d'apexogénèse (suite à un traumatisme ou des lésions carieuses) où le matériau est en contact direct avec le tissu pulpaire (37, 38). Sur le long terme, Bogen a montré en 2008 un taux de succès de 98 % après coiffage direct au MTA suite à une exposition pulpaire accidentelle après curetage (39). Une autre étude a montré en 2014, un taux de succès pour le MTA de 80,5 % sur 10 ans. Ce taux était statistiquement plus élevé que celui de l'hydroxyde de calcium (59 %). Dans les deux cas, la réussite de la thérapeutique était supérieure si la

restauration coronaire définitive était réalisée dans les deux jours suivant le coiffage (40).

Plus récemment, la société Septodont a développé un nouveau ciment silicate de calcium appelé Biodentine®. Ce ciment a un temps de prise plus court que le MTA (10 à 15 minutes contre 4 heures) et des propriétés mécaniques proches de celles de la dentine une fois la prise terminée. Ces propriétés permettent de l'envisager comme substitut dentinaire ou comme restauration provisoire sur le moyen terme (41). Les propriétés biologiques et l'étanchéité de la Biodentine® sont comparables en tout point à celles du MTA. Cela permet de l'utiliser dans les mêmes indications cliniques et notamment celle du coiffage pulpaire direct (42, 43). La Biodentine® a montré son efficacité chez le chien et le cochon comme matériau de coiffage direct avec des résultats comparables au MTA (44, 45). Cependant, très peu d'études existent chez l'être humain. Une étude de 2013 a confirmé son efficacité sur des dents immatures qui allaient être extraites pour des raisons orthodontiques. Après une effraction pulpaire intentionnelle et pose de Biodentine® ou de MTA, la formation d'un pont dentinaire avec une palissade odontoblastique régénérée a pu être mise en évidence (46). Ce pont minéral était cependant plus épais dans le cas de l'utilisation de Biodentine®.

Le coiffage pulpaire direct constitue un premier stade de médecine régénérative appliquée à la chirurgie dentaire. La mise en place d'un biomatériau actif entraîne le recrutement et la différenciation cellulaires qui vont permettre la cicatrisation et le maintien de la vitalité du tissu pulpaire. Cependant cette thérapeutique n'est applicable que sur une pulpe légèrement inflammatoire avec un potentiel de réparation encore présent et nous sommes encore loin de la régénération complète de la pulpe. Le coiffage direct est donc à réserver aux enfants ou aux jeunes adultes. De même, il n'est pas applicable sur des dents nécrosées ou en voie de nécrose. Récemment, une nouvelle technique applicable aux dents immatures nécrosées, appelée revascularisation, a été proposée.

2.1.2 La revascularisation

La régénération du tissu pulpaire se heurte aux mêmes impératifs que pour tout autre organe : la mise en place d'un environnement favorable au développement du tissu cible, le recrutement cellulaire, la différenciation de ces cellules et la vascularisation du tissu néoformé. Et ceci dans une cavité minéralisée dont le seul point d'entrée est le foramen apical qui a un diamètre moyen de 200 μm chez l'adulte. Ce dernier point explique pourquoi les premières tentatives de régénération pulpaire ont été tentées chez de jeunes patients avec des dents en cours de croissance. Chez ces dernières, le foramen apical de la racine en formation peut être d'un diamètre supérieur au millimètre ce qui favorise les échanges entre le canal pulpaire et l'environnement apical de la dent. Les premières tentatives de régénération pulpaire complète sur dents infectées ont eu lieu dans les années 1960-70 avec les travaux de Ostby ou de Myers et Fountain (47, 48). Mais la hauteur limitée du tissu régénéré et son origine qui semblait plus parodontale que dentaire n'ont pas permis le développement d'une thérapeutique fiable et reproductible. Plus récemment, une population inédite de cellules souches a été découverte dans la papille apicale des racines en cours de développement (49, 50). Ces cellules sont appelées *Stem Cells of Apical Papilla* (SCAP). Elles joueraient un rôle dans le développement radiculaire et parodontal et auraient un potentiel de différenciation ostéogénique et dentinogénique. Leur présence pourrait expliquer le succès d'une thérapeutique innovante pour le traitement des dents immatures infectées : la revascularisation.

Le but de la revascularisation est de recruter les cellules souches présentes dans la zone apicale radiculaire afin d'initier le développement d'un néo-tissu au sein de la dent. Idéalement, ce tissu doit être dentinogénique et permettre la poursuite de l'édification radiculaire qui peut se quantifier radiologiquement par l'épaississement des parois radiculaires, l'allongement de la racine et la fermeture du foramen apical. Le recrutement des cellules apicales se fait en initiant une désorganisation et un saignement de la papille apicale. Le sang qui remonte dans le canal contiendrait des cellules souches qui seraient à l'origine du développement d'un tissu conjonctif dentinogénique. La présence de cellules souches mésenchymateuses dans ce saignement a été confirmée en 2011 par Lovelace et coll. (51). Dans les faits, au-

cune étude n'a pu mettre en évidence une régénération effective d'une pulpe dentaire génératrice de dentine. Une étude de 2015 chez le chien a montré la présence de tissu ostéoïde ou cémentoïde dans le canal après traitement (52). Le développement d'un tissu osseux au sein du canal pourrait entraîner l'ankylose de la dent et compromettre sa conservation sur le long terme. Cependant il est important de noter que dans les nombreux « case report » publiés depuis ces dix dernières années, une guérison pratiquement systématique des lésions péri-apicales est observée (53–55). De plus, en cas d'échec (subsistance des signes cliniques, non guérison des lésions péri-apicales), il reste toujours possible de ré-intervenir en mettant en place une technique plus classique de traitement radiculaire. Cette thérapeutique permet donc le développement d'un tissu vivant dans le canal et la guérison clinique de la dent traitée. Cette obturation biologique, à mettre en regard de l'utilisation d'un biomatériau inerte, semble être une étape prometteuse pour l'arrivée de thérapeutiques régénératives en endodontie.

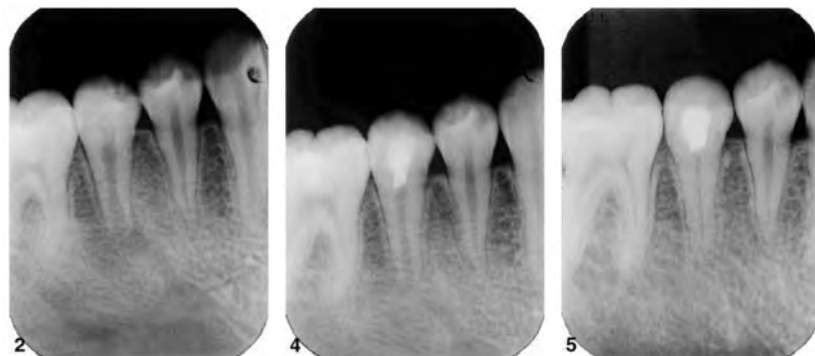


Figure 3 : Radiographie d'une deuxième prémolaire mandibulaire gauche nécrosée avec manifestation péri-apicale (2). Radiographie post-opératoire après mise en place d'une thérapeutique de revascularisation (4). Radiographie de contrôle à 30 mois (5). Un épaississement des parois radiculaires est observable avec une fermeture apicale. La lésion péri-apicale n'est plus visible (53).

Deux protocoles relativement semblables sont proposés actuellement. Leur différence se base sur le moyen utilisé pour réaliser la désinfection canalaire. En effet, l'hypochlorite de sodium, qui est habituellement utilisé dans ce but en endodontie, est contre-indiqué ici. Son action sur la dentine empêcherait l'adhésion cellulaire et serait donc un frein à la mise en place du tissu conjonctif permettant l'obturation canalaire (56). Deux alternatives sont proposées, la première est l'utilisation d'une pâte formée d'un mélange de trois antibiotiques : la ciproflaxine, le métronidazole et

la minocycline. Le dernier fait partie de la famille des tétracyclines et possède donc les mêmes inconvénients avec notamment la coloration secondaire des tissus minéralisés. L'application locale d'antibiotiques reste controversée par un manque de niveau de preuve sur son efficacité et par la possible sélection de mutants résistants. La deuxième alternative est l'utilisation d'hydroxyde de calcium qui a une action bactéricide (57). Son action de dissolution des substances organiques n'empêcherait pas le succès de la revascularisation. Plus d'études sont nécessaires pour valider la revascularisation comme nouvelle thérapeutique de la dent immature infectée. De nombreux « case report » sont référencés (54,55) mais aucune étude clinique n'est disponible.

Les techniques vues précédemment s'intéressent au maintien de la vitalité ou à la régénération du tissu pulpaire. Ces méthodes ouvrent la voix à la régénération de l'organe dentaire. Mais comment envisager la dent sans son environnement biologique qui est le parodonte ? Ce tissu est constitué de la gencive, de l'os alvéolaire, du ligament parodontal et du cément. La régénération de ce tissu ou de l'un de ses constituants fait l'objet de nombreuses recherches. Deux techniques sont actuellement utilisées en clinique : la régénération osseuse guidée et la régénération tissulaire guidée.

2.1.3 La régénération osseuse ou tissulaire guidée (ROG ou RTG)

La nécessité de régénérer le tissu osseux vient des nombreux traumatismes qui peuvent l'atteindre. Les différentes thérapeutiques se sont adaptées aux types et à la taille de ceux-ci. Lorsque des volumes osseux importants sont détruits, il peut être nécessaire de poser différentes prothèses qui vont rétablir la fonction. Cependant, il peut être nécessaire de les remplacer régulièrement, faisant courir un risque supplémentaire aux patients. L'idéal serait de pouvoir régénérer le tissu osseux détruit. Ces méthodes de régénération osseuse sont pour l'instant cantonnées aux lésions de taille intermédiaire. Des matériaux de comblement osseux sont alors utilisés avec ou non la pose d'une membrane. C'est dans ce domaine d'application que se

trouvent la ROG et la RTG. Ces méthodes se basent sur la compréhension récente de l'implication de la matrice extracellulaire (MEC) sur le développement osseux. De simple support passif, elle est maintenant considérée comme l'un des facteurs principaux permettant le recrutement et la différenciation des cellules constituant le tissu osseux (58). La recherche s'est donc orientée vers le développement de biomatériaux capables d'imiter la MEC et de favoriser la régénération osseuse (59). Uniquement l'application de ces techniques en chirurgie dentaire va être développée ici.

Lorsque l'organe dentaire est trop délabré, les techniques actuelles ne permettent pas toujours de le conserver sur arcade. La solution thérapeutique est alors l'extraction. Si l'édentement n'est pas compensé par un soin prothétique (prothèse amovible, implantologie), une perte de l'os alvéolaire peut être observée (60). Cette perte peut être totale si l'édentement est ancien. L'acte chirurgical en soit peut être néfaste pour l'os alvéolaire et des fractures peuvent intervenir lors de la procédure. Le chirurgien dentiste veillera à réaliser une extraction la plus atraumatique possible. Cependant, une fonte de l'os alvéolaire est observée dès le processus de cicatrisation avec un niveau clinique inférieur à celui retrouvé avec la chirurgie. Il se produit ensuite une fonte physiologique du tissu osseux. Cette fonte peut être retardée par la stimulation mécanique induite par le port de prothèse amovible ou par la pose d'un implant (61). Si le patient retarde sa prise en charge thérapeutique, la perte osseuse peut être telle qu'elle rend difficile la réalisation d'un traitement prothétique ou implantaire.

De nombreuses études ont montré une corrélation entre la qualité de l'os, la longueur des implants et le succès thérapeutique. Plus l'implant est court et plus l'os est de mauvaise qualité, moins le succès est bon (62–64). Ces études portaient sur des implants posés en postérieur qui subissent des forces masticatoires importantes. Le succès de la chirurgie est aussi influencé par la position de l'implant sur la mâchoire (65). Il est par exemple conseillé de poser des implants de 12 mm dans un os postérieur maxillaire de mauvaise qualité. En 2015, une étude a montré de bons résultats cliniques après la pose d'implants de 6 mm de longueur avec un succès proche de 96 % après un an. C'est donc la quantité et la qualité de l'os alvéolaire qui deviennent primordiales. Lorsque celui-ci est absent ou en trop faible quantité pour

permettre la pose d'un implant, différentes techniques de régénération osseuse peuvent être mises en place (66). Nous développerons uniquement l'utilisation des différents types de membranes associées à des substituts osseux dans ce travail.

Les techniques de ROG actuelles associent le plus souvent un substitut osseux à une membrane. Les substituts osseux peuvent être d'origine animale (os bovin, coraux) ou d'origine humaine (67–70). L'utilisation de produits d'origine humaine ou animale pose des problèmes d'éthique quant à l'obtention des matériaux et d'éventuelles complications infectieuses et de rejets des greffons. L'idéal serait d'avoir un substitut osseux complètement synthétique avec des résultats équivalents voir supérieurs à ceux obtenus avec des matériaux d'origine biologique. Le développement de substituts osseux à partir de phosphate tricalcique ou de bio-verre fait actuellement l'objet de nombreuses études (71–74).

Les membranes ont eu, au début, un unique rôle de barrière entre le substitut osseux et les tissus mous environnants. En effet, lorsque cette technique est utilisée pour le traitement d'une lésion parodontale, le but est d'éviter la migration des cellules gingivales à l'intérieur du greffon et donc d'inhiber la formation d'un long épithélium de jonction (70). Il est nécessaire de favoriser les cellules osseuses, cimentaires et celles du ligament parodontal pour obtenir une ré-attache parodontale physiologique répondant le mieux aux objectifs thérapeutiques du praticien (75). La même démarche est appliquée lorsque la régénération osseuse a pour but la pose d'un implant (76). Les membranes étaient au départ non-résorbables et nécessitaient une ré-intervention afin de les retirer ce qui pouvait entraîner des complications post-opératoires. Le développement de membranes résorbables a permis d'optimiser les protocoles opératoires (77). Les membranes résorbables doivent répondre au cahier des charges suivant (78–80) :

- être biocompatibles,
- avoir une vitesse de résorption compatible avec l'objectif clinique,
- être manipulable par le chirurgien.

Comme pour les substituts osseux, les membranes peuvent être d'origine biologique ou synthétique. Les plus retrouvées en clinique actuellement sont les membranes d'origines animales. Elles sont en général composées de collagène et proviennent du péritoine de porcs ou de bœufs (81, 82). Ces membranes d'origine animale ont les mêmes inconvénients que les substituts osseux de la même origine avec notamment le risque d'infections croisées (83). C'est pourquoi la recherche s'oriente actuellement vers les membranes d'origine synthétique. Ces membranes sont principalement composées de polyesters (84, 85). Leur excellente biocompatibilité est un atout majeur dans les thérapies de régénération osseuse. De manière générale, les membranes peuvent être fonctionnalisées afin de potentialiser leur action ostéo-inductrice avec l'utilisation de facteurs de croissance tels que les protéines morphogéniques osseuses appelées aussi BMP (Bone morphogenic protein) (86, 87). L'utilisation de membranes fonctionnalisées dans un but de régénération dentaire sera développée dans le chapitre suivant. Dans le cas particulier de l'élévation du sinus maxillaire, les membranes ne sont pas indispensables car c'est le volet osseux qui permet de maintenir le matériau de comblement (Figure 4).

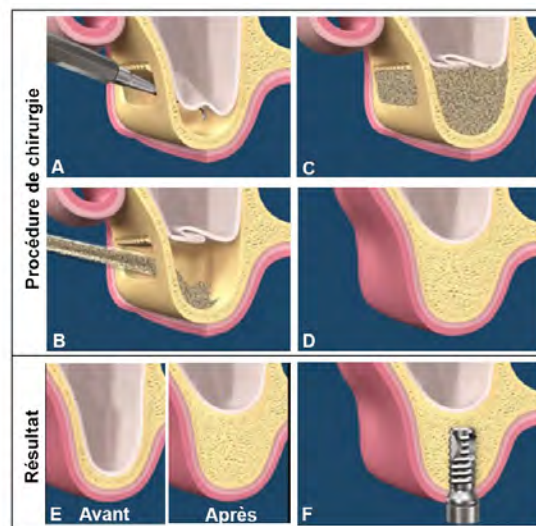


Figure 4 : Procédure d'élévation du sinus maxillaire (Internet: 1888Implant.com)

Ces premiers rappels ont permis de mettre en évidence l'utilisation au quotidien de techniques de médecine régénérative ou d'ingénierie tissulaire en chirurgie

dentaire. Cependant, ces techniques se limitent pour l'instant au contrôle de la vitalité pulpaire dans une certaine mesure et à la régénération de l'environnement parodontal de l'organe dentaire. Aucune technique chirurgicale ne permet encore de régénérer l'organe dentaire ou l'un des tissus le composant. L'idéal serait de pouvoir remplacer la perte d'une dent par une nouvelle dent permettant de retrouver toutes les fonctions physiologiques de cet organe et en particulier la proprioception, fonction qui manque aux implants qui sont complètement ostéo-intégrés. Dans la prochaine partie, les avancées récentes de l'ingénierie tissulaire dans le domaine de la régénération de l'organe dentaire vont être détaillées.

2.2 L'ingénierie tissulaire de l'organe dentaire

Le but à atteindre dans l'évolution des thérapeutiques interventionnistes en chirurgie dentaire est de pouvoir remplacer une dent et son environnement par un implant biologique permettant de retrouver toutes les fonctions de l'organe perdu. La régénération du parodonte avec notamment la présence d'un ligament alvéolo-dentaire et d'un organe dentaire vital permettrait de retrouver les fonctions de proprioception, d'amortissement (protection contre les forces occlusales de mastication) et de défenses immunitaires et tissulaires contre les agressions extérieures. La parfaite ostéo-intégration des implants dentaires en titane ne permet pas de compenser l'absence de ce ligament. La régénération de l'organe dentaire en soit passera par la compréhension du fonctionnement du complexe pulpo-dentinaire. En effet, c'est la pulpe qui sécrète la dentine mais la dentine peut induire des modifications au sein de la pulpe grâce aux protéines qu'elle contient. C'est la synergie entre les deux tissus qui permet à la dent de répondre aux agressions extérieures et donc de résister aux traumatismes.

Le développement de l'ingénierie tissulaire de l'organe dentaire a suivi les mêmes avancées que pour les autres tissus et se construit autour de principes de bases communs à cette discipline. Trois grands axes de recherche ont été décrits par Steindorff et coll. en 2014 (88) :

- L'approche reprenant les concepts clés de l'ingénierie tissulaire qui sont l'utilisation de cellules, d'un "scaffold" (échafaudage, structure, support) et d'un environnement favorable au développement et à la différenciation cellulaire.
- L'approche basée sur l'agrégation cellulaire. Dans le cadre de l'organe dentaire, cette technique s'appuie sur les interactions épithélio-mésenchymateuses. Les sources cellulaires utilisées sont principalement d'origine embryonnaire ce qui peut limiter les applications cliniques directes. Cependant, la compréhension des mécanismes mis en jeu dans le développement dentaire pourrait permettre de mettre au point des thérapeutiques innovantes.

- L'approche basée sur le recrutement de cellules souches dans l'organisme ("cell homing"). Des "scaffolds" fonctionnalisés avec des facteurs de croissance spécifiques à l'organe cible sont implantés. Le recrutement des cellules souches se ferait via la circulation sanguine. L'application en dentaire de cette technique reste limitée.

Malgré des concepts de base différents, ces différentes approches ont certains points communs comme l'utilisation de cellules (souches ou embryonnaires) associées ou non à des "scaffolds" qui peuvent être fonctionnalisés.

2.2.1 Cellules souches d'origine humaine utilisées dans l'ingénierie de l'organe dentaire

Dans cette partie, nous développerons les différents types cellulaires qui sont actuellement étudiés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire appliquée à l'organe dentaire. Nous évoquerons dans un premier temps les cellules souches d'origine humaine puis nous présenterons le modèle murin avec notamment l'utilisation du germe embryonnaire de la première molaire mandibulaire.

Durant les quinze dernières années, plusieurs populations de cellules souches d'origine dentaire ou de son environnement ont été découvertes. Leur origine est très variée. Elles sont retrouvées dans la pulpe des dents adultes et lactéales, dans le ligament alvéolo-dentaire, dans le follicule dentaire ou encore à l'apex des dents en cours de développement. Elles proviennent vraisemblablement de la crête neurale et ont des propriétés proches de celles des cellules souches mésenchymateuses avec une différenciation orientée vers les lignées mésenchymateuses (ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes). La présence de ces cellules souches de manière pratiquement systématique au sein des tissus dentaires ouvre la perspective de nouvelles thérapeutiques en chirurgie dentaire. Le recrutement et la différenciation orientée de ces cellules pourraient permettre de régénérer des tissus dentaires lésés comme la dentine pour lesquels aucune thérapeutique biologique n'est encore disponible.

2.2.1.1 Cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs)

La capacité de cicatrisation de la pulpe dentaire même après des agressions détruisant la couche odontoblastique a longtemps laissé supposer la présence de cellules souches en son sein. Celles-ci se différencieraient en odontoblastes permettant la production de dentine réparatrice qui isolerait la pulpe dentaire de l'origine de l'agression (7, 89). Les premières cellules souches isolées de la pulpe dentaire adulte ont été appelées "dental pulp stem cells" (DPSCs) (90). Elles ont été isolées à partir de 3^{es} molaires permanentes et ont montré une capacité de prolifération élevée ainsi que la production de nodules minéralisés. *In vivo*, elles ont montré un potentiel de différenciation en un tissu dentinogénique, en adipocytes et en cellules de type neural. Toutes les colonies étudiées n'ont pas montré les mêmes potentiels de différenciation ce qui laisse penser qu'il existe différents types de cellules souches au sein de la pulpe dentaire adulte (91).

Leur présence directe au sein de la pulpe dentaire permet d'envisager des applications cliniques rapides.

2.2.1.2 Cellules souches pulpaire des dents lactéales (SHEDs)

Ces cellules sont appelées SHEDs ("stem cells from human exfoliated deciduous teeth"). Elles ont un potentiel de différenciation ostéogénique, dentinogénique ainsi que dans d'autres lignées mésenchymateuses non dentaires (92–94). Elles possèdent des capacités de prolifération supérieures aux DPSCs (95).

Plusieurs études ont montré leur potentiel de différenciation dentinogénique. Le modèle utilisé est celui de la tranche de racine humaine implantée en sous-cutané chez des souris immunodéprimées. Ce modèle a pour avantage de pouvoir transposer les résultats chez l'humain et donc d'envisager une application clinique éventuelle. De plus, la dentine contient de nombreux facteurs de croissance pouvant induire une différenciation odontoblastique. La pulpe présente sur les coupes de racine a été retirée avant d'ensemencer les échantillons directement avec des SHEDs ou sur du

PLLA (acide poly-L lactique) placé auparavant. Après implantation pendant deux à quatre semaines, la différenciation des cellules en odontoblastes a été évaluée grâce au marquage de la sialoprotéine dentinaire. La production de dentine a été évaluée à l'aide d'un marquage à la tétracycline qui colore les tissus en cours de minéralisation (96). Dans une étude similaire, Sakai et coll. (2010) ont montré que les SHEDs avaient en plus de leur potentiel de différenciation odontoblastique, la possibilité d'évoluer en cellules exprimant des marqueurs endothéliaux (CD31, VEGFR2) *in vitro* après mise en contact avec du VEGF (vascular endothelial growth factor). De plus, ces cellules se sont organisées en structures tubulaires ressemblant à des capillaires (93).

Les SHEDs sont des candidates très intéressantes en vue d'une application clinique rapide. En effet, elles sont facilement accessibles étant donné que chaque personne perd une vingtaine de dents lactéales au cours de sa croissance. La cryoconservation de ces cellules pourrait permettre de créer une banque de cellules souches disponibles au cours de la vie d'un individu et permettre des thérapies régénératives selon les besoins. Plusieurs études ont montré qu'après des périodes de cryopréservation variables (de 7 jours à 2 ans), les cellules souches pulpaire conservaient leur potentiel de différenciation (97, 98).

2.2.1.3 Cellules souches du ligament parodontal (PDLSCs)

Le ligament parodontal est un tissu conjonctif qui relie le ciment à l'os alvéolaire. Il est très riche en fibres de collagène et en fibres sensitives. Il joue un rôle d'amortisseur pour contrer les forces occlusales et permet en partie la proprioception. Récemment, des cellules souches ont été trouvées dans ce tissu. Elles joueraient un rôle dans le maintien et la cicatrisation de ce tissu. Elles peuvent se différencier en cellules de lignées mésenchymateuses (cémentoblastes, adipocytes) et produisent du collagène I *in vitro* et *in vivo* (99, 100). Ces cellules sont à envisager pour des applications de régénération parodontale.

2.2.1.4 Cellules souches de la papille apicale (SCAPs)

Ces cellules proviennent de la papille apicale qui se trouve à l'apex des racines en cours de formation. Cette papille n'est présente que lors du développement radiculaire (49). Les SCAPs ont un potentiel de prolifération élevé ce qui en font une source cellulaire intéressante pour l'ingénierie tissulaire. Elles peuvent se différencier en odontoblastes et en adipocytes (100). Sonoyama et coll. (2006) les ont co-cultivées avec des PDLSCs sur un implant en hydroxyapatite de forme radiculaire. Après implantation chez le cochon sur un site extractionnel, une couronne en céramique a été posée sur l'implant (100). Cette thérapeutique innovante pourrait permettre de remplacer l'implant traditionnel en titane par un implant biomimétique. Les SCAPs constituent un pool de cellules souches accessibles aisément après la naissance. Le prélèvement et la conservation des SCAPs après extraction des dents de sagesse pourraient être un point de départ à de futures thérapies cellulaires. Le potentiel des SCAPs est déjà utilisé lors des techniques de revascularisation pulpaire décrites précédemment. Cependant ces thérapeutiques ne sont pas encore fiables et nécessitent d'autres études avant d'être validées.

2.2.1.5 Cellules souches du follicule dentaire

Le follicule dentaire est un tissu qui englobe la couronne lors de sa formation et qui est présent avant l'éruption dentaire. Les cellules le constituant se différencient en fibroblastes du ligament parodontal. Plusieurs études ont montré leur potentiel de différenciation en cémentoblastes ce qui en font, comme pour les SCAPs, un pool cellulaire prometteur pour la régénération parodontale (101–103).

Toutes les cellules décrites précédemment ont un potentiel de différenciation en cellules de la lignée mésenchymateuse. Cependant, il reste complexe de diriger cette différenciation vers des cellules à potentiel odontogénique. De plus, aucune source de cellules épithéliales avec un potentiel odontogénique n'a encore été décrite. Ces limitations pourraient être levées grâce à la compréhension des échanges

complexes qui existent entre les tissus épithéliaux et mésenchymateux lors de l'embryogénèse. Un des modèles les plus couramment utilisé est celui de la souris, avec notamment l'utilisation de la première molaire mandibulaire. Ce modèle est utilisé depuis les années 1970 et a montré de grandes similitudes avec le développement de la dent chez l'être humain (104).

2.2.2 Le modèle de la souris

Le modèle murin est l'un des plus utilisé pour des études portant sur l'organe dentaire et son développement pour plusieurs raisons :

- la croissance rapide des souris et leur taux élevé de reproduction permettent d'évaluer rapidement les résultats des expérimentations,
- après une période d'apprentissage, il est aisé de prélever les germes embryonnaires et de les mettre en culture,
- le développement de la dent chez la souris suit les mêmes stades que chez l'être humain ce qui permet d'envisager la transposition des résultats pour une application clinique éventuelle.

2.2.2.1 Le germe de 1^{re} molaire mandibulaire de souris

Le germe dentaire peut servir de base en soit pour l'étude du développement dentaire (105) (Figure 5). Cependant, l'un des grands intérêts de ce modèle est la possibilité de dissocier les deux tissus constituant le germe : l'épithélium et le mésenchyme. Ceci va permettre d'étudier les interactions épithélio-mésenchymateuses et de mieux définir le rôle de chaque tissu dans le développement de la dent. Il sera aussi possible de changer les pools cellulaires étudiés afin d'essayer d'induire le potentiel odontogénique de certaines populations cellulaires.



Figure 5 : Photographie d'un germe dentaire de première molaire mandibulaire de souris au stade JE14 (jour embryonnaire).

2.2.2.2 Les réassociations épithélio-mésenchymateuses

Il existe plusieurs types de réassociations épithélio-mésenchymateuses (106–110) :

- Les réassociations tissu/tissu. Les deux tissus sont replacés l'un sur l'autre après dissociation.
- Les réassociations tissu/cellule. L'un des deux tissus est dissocié en cellules unitaires. Un culot de cellules est ensuite réassocié avec le tissu non dissocié.
- Les réassociations cellules/cellules. Chaque tissu est dissocié en cellules unitaires. Un culot de cellules mésenchymateuses est ensuite recouvert d'un culot de cellules épithéliales.

Il est aussi possible de réassocier des tissus issus de dents différentes (incisives et molaires) ce qui a permis de mettre en évidence le rôle des cellules mésenchymateuses dans l'induction de la morphologie coronaire (111, 112).

La vascularisation *in vivo* des réassociations est un grand pas vers la régénération d'un organe dentaire complet (113). La cinétique de cette vascularisation a été étudiée. Elle débute après quatre jours d'implantation en sous-cutané chez la souris ICR et après deux semaines, la couche odontoblastique est atteinte. La même expérience répétée chez des souris GFP a mis en évidence que la vascularisation venait de l'hôte (113). C'est d'ailleurs grâce à cette vascularisation que le développement dentaire peut se poursuivre avec la maturation des odontoblastes et la différenciation des améloblastes qui produisent alors de l'émail.

Le challenge suivant est d'innervier la dent formée. L'innervation de la dent chez la souris débute au jour embryonnaire JE11 avec la présence de fibres nerveuses à proximité de la lame dentaire notamment grâce au NGF (nerve growth fac-

tor) (114). Ces fibres sont identifiées au niveau du bourgeon dentaire au 13^e jour embryonnaire et dans la papille dentaire au 18^e jour jusqu'à la couche odontoblastique (115, 116). Ce moment coïncide avec l'activation des odontoblastes et la production de pré dentine ce qui explique que des fibres nerveuses sont retrouvées dans les tubuli dentinaires. Cette innervation est régulée par de nombreux facteurs de croissance tels que le NGF ou encore le BDNF (brain derived neurotrophic factor) (117).

L'absence de ces facteurs de croissance lors d'implantations en sous-cutané peut expliquer la non-innervation des implants. Cependant des travaux récents effectués par l'équipe U 1109 ont montré que l'innervation était aussi régulée par immuno-modulation (108). En effet, avec la présence d'une source nerveuse adéquate à proximité (ganglion trigéminal), il est possible d'initier l'innervation de la pulpe dentaire chez la souris "nude" (souris athymique immunodéprimée) après implantation en sous-cutané. De même, l'administration d'une médication antirejet (cyclosporine A) chez la souris ICR a permis d'obtenir les mêmes résultats. Ces travaux mettent en évidence la complexité des facteurs qui entrent en jeu dans l'innervation de la pulpe (108) (Figure 6).

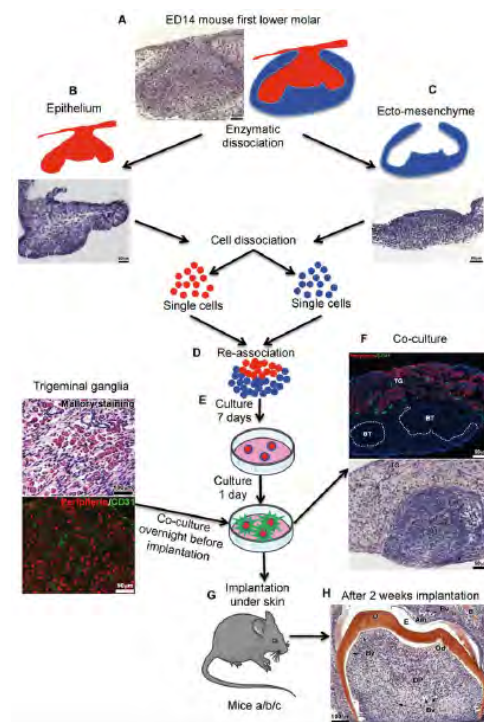


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de mise en oeuvre des réassociations épithélio-mésenchymateuses appliquées à l'organe dentaire (108).

Cependant, ces résultats restent difficilement transposables tels quels pour une application clinique mais sont à la base du développement de stratégies innovantes pour la régénération de l'organe dentaire. Dans ce travail, le germe embryonnaire de souris au 14^e jour embryonnaire non dissocié a été utilisé comme modèle. Ce germe a été associé à une membrane lors de l'implantation dans le but de faciliter le développement de l'organe dentaire et de son environnement. Dans la prochaine partie, les différents biomatériaux utilisés pour des applications dans la régénération de la dent vont être développés.

2.2.3 Les biomatériaux utilisés en ingénierie de l'organe dentaire et leurs méthodes de fabrication

Afin d'évoluer dans les thérapeutiques proposées aux patients, il devient nécessaire de passer de traitements utilisant des matériaux inertes ou peu actifs à des traitements complètement biologiques (118, 119). L'ingénierie tissulaire tend à répondre à cette problématique grâce à plusieurs concepts de base :

- l'utilisation de cellules souches post-natales (120),
- un "scaffold" tridimensionnel à l'architecture contrôlée (121),
- l'utilisation de facteurs de croissance (122).

Le but du "scaffold" est de servir de support aux cellules et d'orienter leur différenciation. Une des stratégies les plus utilisées est de mimer la matrice extracellulaire (MEC) et donc de mimer l'environnement naturel des cellules. De plus, la composition chimique du matériau peut aussi avoir une influence sur l'adhésion et la prolifération cellulaire. Dans cette partie, plusieurs biomatériaux et leur méthode de fabrication vont être détaillés. Ils sont actuellement utilisés en ingénierie de l'organe dentaire.

Le "scaffold" doit être biocompatible, permettre l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire, se dégrader de façon contrôlée et avoir des propriétés mécaniques adéquates au but recherché. Pour la dent, différents matériaux peuvent répondre à ces critères comme les polymères ou les céramiques.

2.2.3.1 Les polymères d'origine naturelle

Les polymères biologiques ont été les premiers à être utilisés dans le domaine de l'ingénierie de l'organe dentaire grâce à leur excellente biocompatibilité, de leur bioactivité et de leur potentiel à induire la différenciation tissulaire. Ils ont comme inconvénients les risques d'infections croisées s'ils sont d'origine animale et peuvent induire une réponse immunitaire de l'hôte et donc un rejet.

2.2.3.1.1 Le collagène

Le collagène est la principale protéine constituant la MEC du cartilage, de l'os, de la dentine ou encore de la peau. Des membranes constituées de collagène sont déjà utilisées pour la régénération osseuse en clinique avec des résultats fiables et reproductibles notamment dans les techniques de ROG. Notre équipe a montré leurs propriétés ostéoinductrices qui peuvent être potentialisées en le fonctionnalisant avec des facteurs de croissance tels que la BMP-2 (86) (Figure 7).

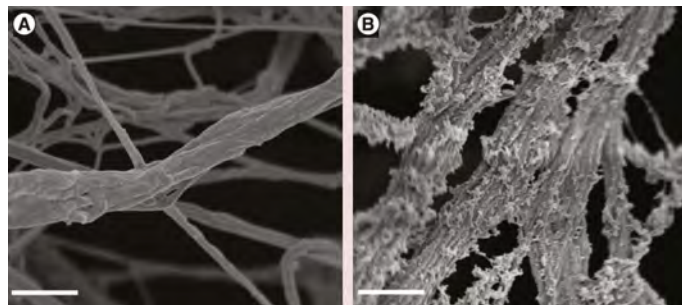


Figure 7 : Image de MEB d'une membrane Bio-GideTM avant (A) et après fonctionnalisation (B) par des nanoréservoirs de facteurs de croissance (86).

Dans le cas de la dent, des éponges de collagène ont montré leur efficacité pour l'adhésion et la prolifération de cellules dentaires dissociées de porcs. Plusieurs zones minéralisées ont été observées en comparaison avec l'utilisation d'un "scaffold" constitué d'acide poly-glycolique (123). Prescott et coll. ont montré en 2008 que des DPSCs ensemencées sur une éponge de collagène en présence de la protéine dentinaire matricielle I pouvaient s'organiser en un tissu conjonctif proche de la pulpe (124). Cependant, aucune minéralisation n'a pu être observée. Ces résultats *in vitro*

n'ont pas été confirmés *in vivo* lors d'implantations en sous-cutané chez la souris "nude" (125). L'utilisation des DPSCs en clinique n'est pas encore d'actualité mais il serait intéressant de poursuivre les expérimentations avec des sites d'implantations maxillo-faciaux. C'est ce qu'a réalisé l'équipe de Tsuji mais avec un autre modèle cellulaire : celui des cellules embryonnaires de souris (126, 127). Dans ce travail, ils utilisent le collagène sous forme de gel pour faciliter la réassociation cellulaire avant implantation dans la capsule rénale. Les implants sont ensuite explantés et réimplantés dans la mandibule d'une souris. Ils parviennent ainsi à remplacer l'absence d'une dent par un nouvel organe qui semble être parfaitement ostéo-intégré. Ces résultats n'ont cependant jamais été confirmés par une autre équipe de recherche.

Le collagène peut aussi être associé à d'autres polymères comme le chitosan.

2.2.3.1.2 Le chitosan

Le chitosan est un polymère dérivé de la chitine qui est parfaitement biocompatible et biodégradable. Il a de nombreuses applications en ingénierie tissulaire comme scaffold et comme molécule pour fonctionnaliser des biomatériaux (86, 87, 128) (Figure 8).

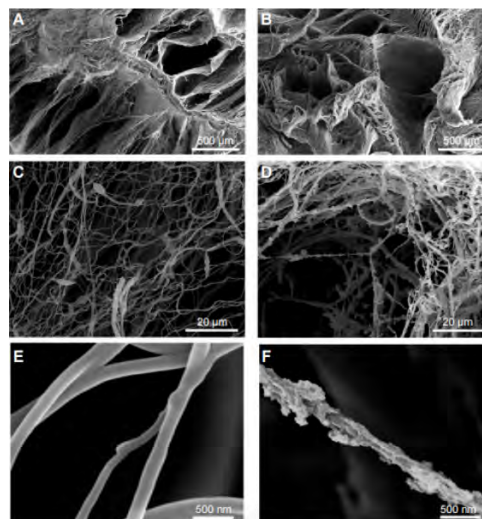


Figure 8 : Images de MEB d'une membrane épaisse électrospinnée en PCL non fonctionnalisée (A, C, E) et fonctionnalisée (B, D, F) par des nanoréservoirs constitués de chitosan et de BMP-7 (87).

Dans le cadre de la dent, le chitosan a pu être associé au collagène pour former un "scaffold" multicouches tridimensionnel. Des DPSCs et des cellules dentaires épithéliales de la lignée HAT-7 ont étéensemencées dessus. Cette technique a permis de faciliter la co-culture et la réassociation de ces cellules et a permis la production de nodules calciques après seulement 24 heures (129). Plus récemment, un "scaffold" macroporeux de chitosan a étéensemencé avec des DPSCs ou avec des SHEDs. Les deux populations cellulaires ont montré une bonne prolifération et une excellente viabilité sur ce biomatériau (130).

2.2.3.1.3 La soie

Les protéines de la soie sont biodégradables, biocompatibles, non immunogènes, et approuvées par la FDA (Food and Drug Administration), ce qui facilite les applications cliniques. Leur utilisation est déjà confirmée pour la régénération osseuse (131, 132).

Dans le domaine de la régénération dentaire, la fibroïne de soie a été utilisée pour créer des "scaffolds" nanofibreux afin d'y cultiver des DPSCs. Ces cultures ont été associées à du "basic fibroblast growth factor" (bFGF) et placées au contact de coupes de dentine. Les cellules ont montré une excellente viabilité avec une morphologie allongée. Elles se sont organisées en tissu ressemblant à de la dentine et ont produit un tissu minéralisé ayant des caractéristiques communes avec la dentine (133). Les mêmes auteurs ont utilisé le même modèle cellulaire avec la fibroïne de soie, mais avec une implantation dans un modèle de revascularisation pulpaire canin à apex fermés (134). Dans cette étude, les DPSCs ont été cultivées en présence de "stromal cell-derived factor-1 α " (SDF-1 α). Les résultats ont montré la formation d'un tissu producteur de dentine contre les parois radiculaires. Cette étude est intéressante car le modèle permet d'envisager des techniques de revascularisation chez l'adulte.

Des germes dentaires post-nataux de rats ont été cultivés sur un "scaffold" poreux (pores de 250 μ m à 550 μ m) de soie associé ou non à de l'acide arginine-glycine-aspartique (135). Dans tous les cas, un tissu minéralisé s'est formé après vingt

semaines de culture dans le péritoine de rat. Cependant aucune structure dentaire n'a pu être identifiée.

De la soie enrobée d'hydroxyapatite etensemencée avec des PDLCs ou des DPCs a montré de bons résultats pour la régénération parodontale sur un modèle canin (136). Aucune différence histologique n'a été observée entre les deux types cellulaires après huit semaines d'implantation.

La soie semble être un biomatériau intéressant pour la régénération de tissu minéralisé ou la culture de cellules pulpaires. Ses propriétés non-immunogènes en font un candidat pour des applications chez l'être humain.

2.2.3.1.4 L'alginate

L'alginate est un polysaccharide naturel issu d'algue brune. Il est biocompatible, peut former un gel et est peu immunogène. Il est couramment utilisé pour l'ingénierie tissulaire du cartilage et pourrait aussi avoir des applications pour l'organe dentaire (137) (Figure 9).

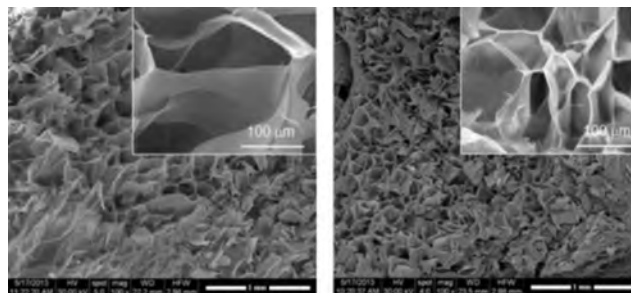


Figure 9 : Images de MEB de gels d'alginate avec différentes porosités (137).

L'alginate a été utilisé en sphère pour la culture de DPSCs à des fins de régénération osseuse (138). Le but était d'immobiliser les cellules afin de favoriser leur potentiel ostéogénique. Les résultats montrent une plus forte expression d'ostéocalcine et de gènes ostéogéniques (ALP, Runx-2 et OCN) que lors de cultures avec un milieu classique. De plus, d'importants dépôts minéraux ont pu être mis en évidence après une coloration au rouge d'Alizarine. Il est intéressant de voir que des cellules souches pulpaires expriment facilement des marqueurs ostéogéniques. Il

reste donc nécessaire de maîtriser les voies de différenciation de ces cellules avant d'envisager une application clinique.

L'alginate permet donc la culture 3D des cellules. Certains auteurs se sont demandés si les SCAPs changeaient de comportement dans ces conditions. Somoza et coll. (2015) ont montré que dans un gel d'alginate, les SCAPs produisaient dix fois plus de TGF- β 3 que dans des conditions de culture 2D classiques (139). Le TGF- β 3 est un facteur de croissance impliqué dans la régénération et la réparation tissulaire. Son expression augmentée dans un environnement 3D souligne l'importance des signaux micro-environnementaux transmis entre les cellules. Lambricht et coll. (2014), quant à eux, ont montré que la composition du "scaffold" pouvait avoir une influence sur la survie et la prolifération cellulaire des SCAPs (140) en comparant des gels d'alginate, d'acide hyaluronique, le Matrigel et le Corgel. Les meilleurs résultats ont été trouvés pour le Matrigel avec 70 % de viabilité à sept jours de culture.

Un des avantages des gels d'alginate est de pouvoir les gélifier dans la forme souhaitée grâce à des moules. Bhoj et son équipe (2015) ont réalisé des "scaffolds" en alginate qui ont une forme de cônes de Gutta percha (biomatériau utilisé pour l'obturation en endodontie) (141) (Figure 10).

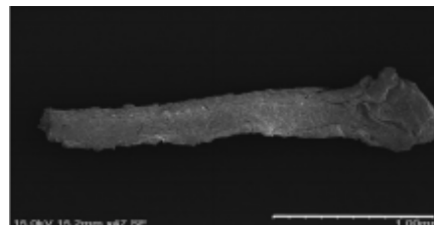


Figure 10 : Image de MEB du gel d'alginate avec une forme adaptée à une insertion dans un canal radiculaire (141).

L'intérêt est d'envisager une application clinique de leurs résultats. Il serait en effet possible de placer ces cônes d'alginate à la fin d'une préparation canalaire afin d'initier une recolonisation du système canalaire et donc d'obtenir une obturation biologique. Dans cette étude, les cônes d'alginate ont étéensemencés de DPSCs et d'HUVECs (cellules endothéliales du cordon ombilical) et associés ou non à deux facteurs de croissance : le VEGF121 et le FGF (Figure 11).

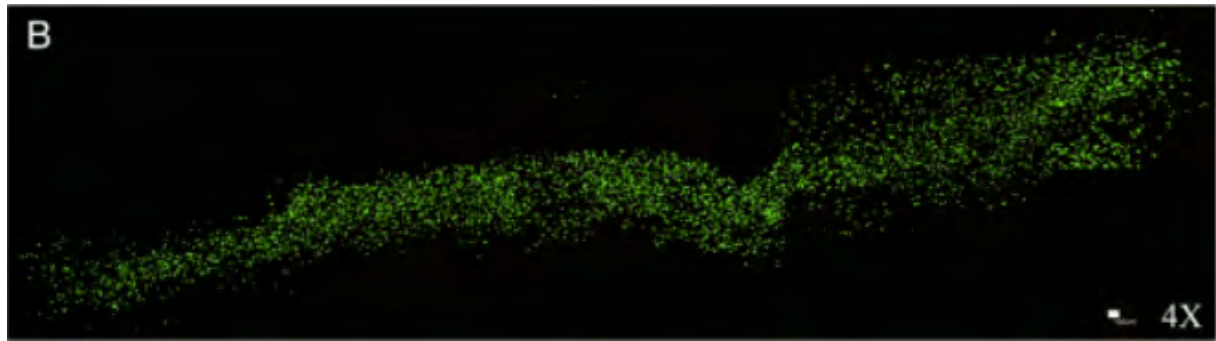


Figure 11 : Image de microscopie confocale de l'implant en alginate recouvert de DPSCs et d'HUVECs (141).

Tous les groupes ont montré une bonne répartition des cellules le long de la structure. La viabilité et la prolifération cellulaire étaient meilleures dans le groupe avec les facteurs de croissance. Cependant, cette étude a uniquement été menée *in vitro*. Il serait intéressant de réaliser une étude *in vivo* avec ces implants.

Cette dernière étude montre clairement que les applications cliniques sont bientôt envisageables avec ces stratégies. L'alginate a l'avantage de se gélifier et donc de pouvoir prendre la forme souhaitée. Il est aussi possible de l'injecter ce qui est une solution élégante pour des applications en endodontie où l'anatomie du système canalaire est très variable. Cependant ce n'est pas le seul polymère qui a ces avantages : l'acide hyaluronique a des propriétés très proches.

2.2.3.1.5 L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un polysaccharide retrouvé dans le cartilage, l'humour vitré ou encore le liquide synovial. Il a été envisagé comme matériau de coiffage pulpaire dès les années 1990 (142). Une étude plus récente a confirmé cette indication avec de meilleurs résultats de viabilité cellulaire en comparaison avec le collagène (143). Il pourrait donc être utilisé comme "scaffold" en ingénierie de la pulpe dentaire, mais peu d'études existent sur le sujet. Il a cependant montré un potentiel pour la culture de SCAPs ce qui confirme son potentiel pour la régénération dentaire (140).

2.2.3.1.6 Les peptides/protéines

Les peptides et les protéines sont formés d'acides aminés et peuvent avoir des propriétés compatibles avec une application en ingénierie tissulaire. Par exemple, des peptides amphiphiles ont montré la possibilité de s'auto-assembler en un gel qui permet la culture cellulaire de SHEDs ou de DPSCs (144). Les deux types cellulaires ont montré des comportements différents après quatre semaines de culture. Les SHEDs se sont différenciées en un tissu conjonctif avec une prolifération élevée et production de collagène, alors que les DPSCs ont eu une prolifération moins rapide mais ont exprimé des marqueurs ostéoblastiques et ont produit des nodules minéralisés.

Tout comme les polymères biologiques, les polymères synthétiques sont utilisés en ingénierie tissulaire.

2.2.3.2 Les polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont une alternative aux "scaffolds" d'origine biologique. Ils ont l'avantage d'éviter les infections croisées ou encore d'être facilement manipulables. Ils sont l'avenir de l'ingénierie tissulaire. Leur utilisation notamment pour l'ingénierie tissulaire du tissu osseux par exemple est de plus en plus répandue. Certaines études se consacrent à leur mise en œuvre avec des cellules d'origine dentaire.

2.2.3.2.1 Le poly (ethylene glycol) (PEG)

Le PEG est non toxique, biocompatible, peu immunogène et est dégradé *in vivo*.

En association avec de la fibrine sous forme d'un hydrogel, il a montré un potentiel pour la vascularisation *in vivo* dans le modèle murin ce qui pourrait avoir des applications dans les techniques de revascularisation (145). En association avec

de l'acide polylactique, le PEG a permis la culture de DPSCs (146). Par contre, les cellules ont alors exprimé des marqueurs cartilagineux.

2.2.3.2.2 L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA)

C'est un polyester synthétique issu d'une réaction entre l'acide lactique et l'acide glycolique. Il est biocompatible, biodégradable mais peut entraîner une légère inflammation locale.

Des SHEDs ont été cultivées sur des scaffolds en poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA). Ils ont montré une bonne viabilité et une différenciation en cellules ostéoblastiques (147). Le PLGA a aussi permis la différenciation de DPSCs en cellules polarisées productrices d'un tissu minéralisé proche de la prédentine dans un modèle porcin *in vivo* (148). Des tranches de racine ont étéensemencées avec un gel de PLGA contenant des DPSCs avant réimplantation sur le site d'extraction. La différenciation des cellules a été progressive pendant la durée d'implantation (10 semaines). Le "scaffold" a été dégradé et remplacé par de la MEC. Des applications dans la régénération pulpaire sont donc envisageables pour le PLGA. Le PLGA associé à du TCP (tri-calcium phosphate) a montré de bons résultats pour la culture de DPSCs comparativement à l'HA ou au TCP seul (149).

2.2.3.2.3 Le polycaprolactone (PCL)

Le PCL est un polyester avec une activité biologique limitée mais avec une dégradation relativement lente ce qui en fait un biomatériau intéressant pour l'ingénierie de tissus lents à se régénérer comme l'os ou la dent.

Grâce à ses caractéristiques, le PCL est utilisable pour la régénération parodontale. Il est utilisable avec un "coating" (enrobage) de calcium-phosphate pour la culture de PDLCs et peut promouvoir la régénération parodontale après quatre semaines d'implantation dans un défaut osseux maxillo-facial sur un modèle de rat (150). Dans une autre application, mais toujours avec des cellules dentaires, un

"scaffold" électrospinné de PCL et de gélatine a permis la culture *in vitro* de SHEDs (151). Cette étude permet de mettre en évidence le potentiel de régénération nerveuse des SHEDs. En effet, sur un modèle de lésion du nerf sciatique chez le rat, l'implant ensemencé de SHEDs a permis une régénération nerveuse plus rapide. Les SHEDs pourraient donc trouver une application lors des techniques de revascularisation afin de favoriser l'innervation de dents nécrosées. Enfin le PCL peut aussi prendre des formes très variées. Dans une approche faisant appel au "cell homing", une étude a montré que des implants en forme d'incisive ou de molaire de rats et chargés en "stromal-derived-factor-1" (SDF-1) et en "bone morphogenetic protein 7" (BMP-7) pouvaient recruter des cellules de l'hôte et favoriser une réattache parodontale (152).

À l'opposé des biomatériaux organiques, les céramiques sont aussi utilisables en ingénierie tissulaire.

2.2.3.3 Les céramiques

La dentine est un tissu minéralisé essentiellement composé d'hydroxyapatite (HA) (70 %) et d'une matrice organique (collagène, eau). La dentine elle-même peut servir de "scaffold" pour promouvoir la différenciation cellulaire. Ce modèle permet de transposer les résultats plus rapidement vers une application clinique. Mais si la dentine peut favoriser la différenciation cellulaire, peut-être que son composant principal le peut aussi.

Une étude a montré qu'un "scaffold" composé d'HA poreuse était utilisable pour induire une différenciation de SHEDs en cellules à phénotype ostéoblastique (153). Les mêmes résultats ont été retrouvés dans cette étude en associant l'HA à différents types de polymères. De l'HA nanométrique a été associée à un "scaffold" de polycaprolactone (PCL) et de gélatine ce qui a eu pour effet de potentialiser la différenciation de DPSCs en cellules odontoblastiques (154). Par contre, ces cellules peuvent aussi exprimer des marqueurs ostéoblastiques lorsque l'HA est associée à du β -TCP (155).

Après ces rappels sur les différents biomatériaux actuellement utilisés en ingénierie tissulaire en dentaire, deux techniques vont être développées. Ces deux techniques sont mises en œuvre dans le présent travail pour le développement de notre "scaffold" : l'électrospinning et la fonctionnalisation par la technique des multicouches de poly-électrolytes.

2.3 Mise en œuvre d'une membrane originale

Il existe de nombreuses techniques pour produire des membranes à partir de polymères telles que l'électrospinning, la lixiviation de porogènes ou la séparation de phase thermiquement induite. Nous ne détaillerons pas ces deux dernières techniques mais seulement l'électrospinning qui est la technique que nous avons choisi d'utiliser car il permet de produire des membranes nanofibreuses mimant la structure de la MEC.

2.3.1 L'électrospinning

L'électrospinning permet la production de membranes constituées de nanofibres de polymère enchevêtrées aléatoirement. Le diamètre des fibres peut aller de quelques nanomètres à quelques micromètres. Le principe de l'électrospinning est relativement simple : une solution de polymère conductrice est éjectée au sein d'un champ électrique grâce à une aiguille. La différence de potentiel entre l'aiguille et le collecteur va permettre la formation d'un jet en bout d'aiguille qui va être accéléré et étiré jusqu'au collecteur. Les solvants présents dans la solution constituant le jet s'évaporent lors du trajet entre le bout de l'aiguille et le collecteur, ne restent plus alors que des nanofibres de polymère à la surface du collecteur. En général, le système est confiné dans une enceinte afin de contrôler les paramètres atmosphériques tels que la température, la pression et l'hygrométrie qui peuvent influencer la procédure. De même, en fonction du collecteur, différents types de nanostructures pourront être obtenus (architecture particulière, fibres alignées) (156) (Figure 12).

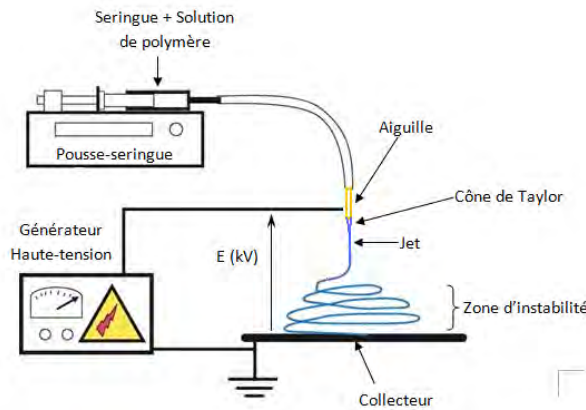


Figure 12 : Schéma du montage de l'électrospinning

Le diamètre des fibres peut varier en fonction de différents paramètres :

- la concentration en polymère de la solution,
- le type de solvants choisis,
- la conductivité de la solution,
- la viscosité de la solution,
- les conditions atmosphériques.

La variation de ces paramètres peut entraîner un jet instable ce qui rend la procédure non reproductible. Le diamètre des fibres pourra être variable sur une même membrane notamment à cause de la présence de « beads ». Ce sont des défauts de diamètre variable présents le long des fibres qui peuvent compromettre ou faire varier les résultats expérimentaux en modifiant le comportement cellulaire par exemple (157).

Dans l'équipe U1109 "nanomédecine régénérative ostéo-articulaire et dentaire", les membranes ont été largement utilisées et caractérisées à des fins de régénération osseuse. Leur potentiel ostéoinducteur n'est plus à démontrer. Il a donc été décidé de les utiliser dans cette étude afin de parvenir à régénérer une unité os/dent. L'autre avantage de ces membranes est la possibilité de les fonctionnaliser avec des facteurs de croissance pour améliorer leurs propriétés. La technique de fonctionnalisation choisie est la technique des multicouches de polyélectrolytes appelée aussi "layer-by-layer" (LBL).

2.3.2 La technique des multicouches de polyélectrolytes (LBL)

Cette technique de fonctionnalisation est principalement utilisée pour la libération de principes actifs au cours du temps. Son principe de mise en œuvre repose sur l'adsorption alternée de polyélectrolytes de charges électriques opposées sur un substrat (158) (Figure 13). Une molécule active peut être incorporée au sein d'un tel film de multicouches. Cette technique de fonctionnalisation est parfaitement adaptée à une utilisation en ingénierie tissulaire :

- les molécules incorporées dans les LBL gardent leurs propriétés au cours du temps (159),
- les doses adsorbées sont très faibles ce qui limite les risques de toxicité (160),
- la libération de la molécule est contrôlée (161).

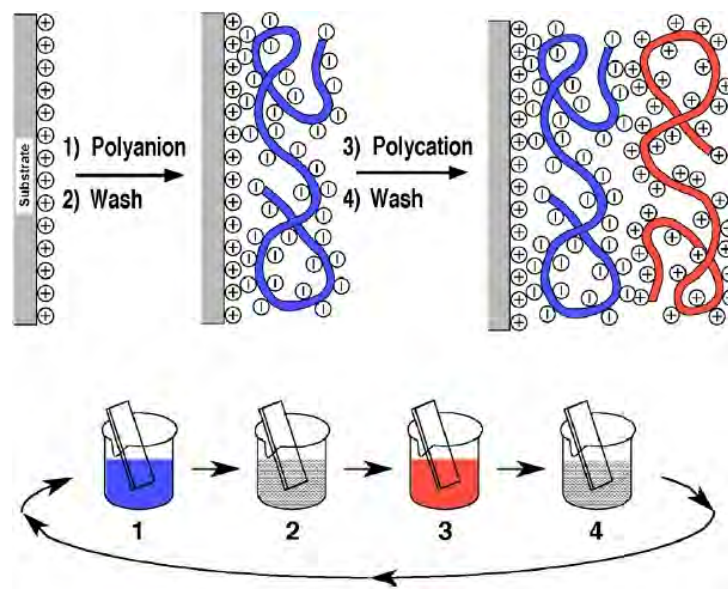


Figure 13 : Schéma représentant la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes (158).

La durée de libération du principe actif est fonction du nombre de bicouches ce qui permet de varier la durée d'activité de l'implant. Il est aussi possible de changer de molécules actives dans un même assemblage. Différentes molécules pourront ainsi agir sur leur environnement les unes après les autres. Lorsque cette technologie est utilisée sur des membranes électrospinnées, il se forme des nanoréservoirs à la surface des fibres. La forme des nanoréservoirs est dépendante du type de molécules utilisées. Ils peuvent prendre la forme de sphères ou encore d'écailles (Figure

14) (162). La libération du principe actif se ferait par hydrolyse des nanoréservoirs au contact des cellules. Ces mécanismes ne sont pas encore entièrement élucidés.

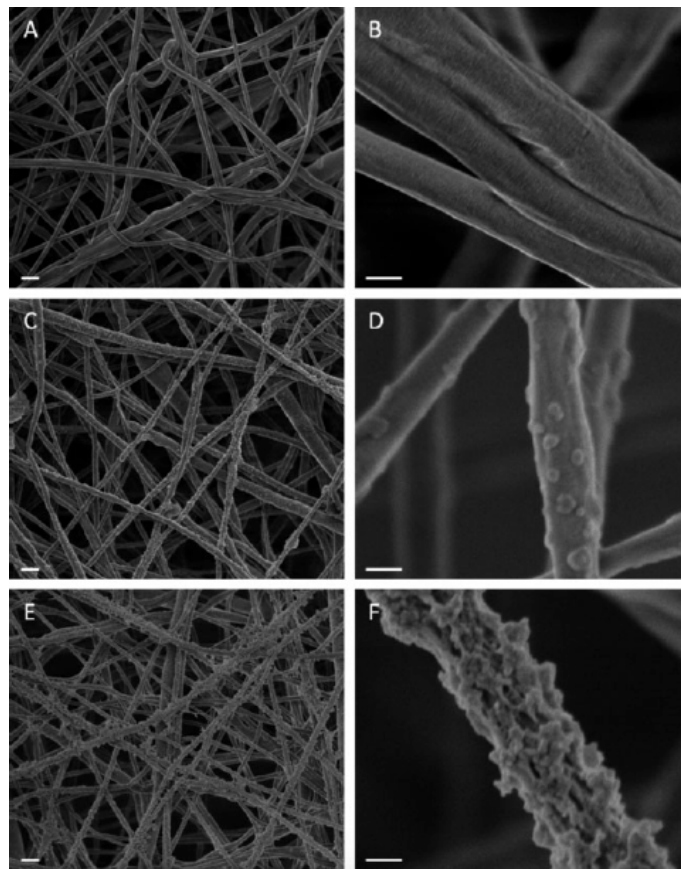


Figure 14 : Image de MEB à différents grossissements des nanofibres d'une membrane électrospinnée de PCL (A et B) avant fonctionnalisation, après fonctionnalisation avec la technique des LBL avec (PLL/BMP-2)₃ qui donne des nanoréservoirs de forme sphérique (C et D) et après fonctionnalisation avec la technique des LBL avec (CHI/BMP-2)₃ qui donne des nanoréservoirs en forme d'écaille (E et F). Barres : A, C et E = 1 μm; C, D et F = 100 nm

III. Objectifs du travail

La majorité des pathologies bucco-dentaires, qu'elles soient d'origine bactérienne ou traumatique, s'accompagnent d'une perte de substance dentaire. Cette perte de substance peut concerner les tissus durs de la dent (émail, dentine, cément), la pulpe dentaire qui produit la dentine ou le parodonte (gencive, os alvéolaire, ligament parodontal). Dans le cas le plus complexe, l'organe dentaire est perdu en totalité et peut s'accompagner d'une fonte osseuse.

Les thérapeutiques actuelles se basent sur l'utilisation de biomatériaux afin de reconstituer la perte de substance. Les plus couramment utilisés sont les résines composites, les céramiques et les métaux. Comme détaillé précédemment, ces thérapeutiques ne permettent pas de régénérer les tissus perdus. Certaines thérapeutiques comme le coiffage pulpaire direct et la régénération osseuse/tissulaire guidée font déjà appel aux principes de l'ingénierie tissulaire ; de même que la technique de revascularisation qui tente de régénérer le tissu pulpaire mais sans toutefois parvenir à contrôler la nature du tissu régénéré ni à l'innervier. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de thèse.

La stratégie repose sur l'utilisation de membranes nanostructurées, constituées de polycaprolactone (PCL), obtenues par électrospinning. Ces membranes ont fait l'objet de nombreuses études dans notre équipe (86,87,162). Leur potentiel pour la régénération osseuse a déjà été démontré. De plus, la possibilité de les fonctionnaliser par la technique des multicouches de polyélectrolytes pourrait en faire aussi un support intéressant pour la régénération dentaire.

Deux grands axes de recherche ont été explorés :

1- Le développement d'un implant permettant la régénération de l'unité os/dent

Cliniquement, la dent et le parodonte sont deux entités indissociables. La perte de l'organe dentaire est l'une des conséquences des parodontites en phase terminale. De même, la perte de l'organe dentaire entraîne une fonte du parodonte. L'objectif est donc de développer un implant permettant la régénération de la dent et de son environnement parodontal. La stratégie repose sur l'utilisation d'une membrane ayant déjà fait ses preuves pour la régénération du tissu osseux.

2- Le développement d'un implant permettant l'innervation de l'organe dentaire

La proprioception est essentielle au niveau dentaire car c'est elle qui va permettre de contrôler les forces appliquées lors de la mastication. La nociception, quant à elle, va avertir le patient entre autre de la présence d'une éventuelle pathologie. Ces notions sont possibles grâce à l'innervation. Or, dans les techniques de revascularisation actuelle, aucune innervation du tissu régénéré dans le canal pulpaire n'a pu être mise en évidence. La présente stratégie repose sur le développement d'un implant fonctionnalisé avec le "Nerve Growth Factor" (NGF) permettant la croissance d'un germe dentaire et son innervation.

Parallèlement au développement de ces implants, une évolution de la technique des réassociations épithélio-mésenchymateuses a été étudiée. Ces résultats seront détaillés en annexes.

IV. Matériel et méthodes

Toutes les expériences sont réalisées sous l'autorisation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous le numéro 01715.01.

4.1 Préparation, fonctionnalisation et caractérisation des membranes

4.1.1 Production des membranes par électrospinning

4.1.1.1 Préparation de la solution de polymère

Le polymère utilisé pour la production des membranes est le polycaprolactone (PCL). Il est dissous dans un mélange de dichlorométhane (DCM) et de diméthylformamide (DMF). La solution est composée de PCL à 23 % (23 mg pour 100 mL) solubilisé dans un mélange de DCM/DMF avec un rapport de 40 pour 60. Après préparation, la solution est mélangée pendant la nuit.

4.1.1.2 Mise en œuvre de l'électrospinning

L'appareillage utilisé était un Apparatus EC-DIG produit par IME Technologies (Amsterdam, Pays-Bas). Il était composé des éléments suivants (Figure 15):

- une enceinte fermée munie d'une aération reliée à une hotte chimique,
- un pousse-seringue,
- un support permettant de maintenir l'aiguille permettant la distribution de la solution,
- un collecteur conducteur,
- un générateur permettant la mise en place d'une tension allant de -25 à +25 kV entre l'aiguille et le collecteur,
- un écran tactile permettant de paramétrer la machine,

La solution de polymère a été placée dans une seringue de 5 mL installée sur le pousse-seringue qui était à l'extérieur de l'enceinte. La seringue était reliée à l'aiguille par un tuyau. Un soin particulier a été porté à l'herméticité au niveau de la zone

de passage du tuyau dans l'enceinte. La solution de PCL a alors été électrospinnée pendant 20 minutes sous une tension de 22 kV à un débit fixe de 0,4 mL/h. L'aiguille était à 16 cm du collecteur sur lequel était placée une feuille d'aluminium afin de pouvoir récupérer la membrane. Il était nécessaire de contrôler la température et l'hygrométrie de la pièce afin d'obtenir des résultats reproductibles. Un chauffage et un humidificateur d'air ont été nécessaires. La température et l'hygrométrie ont été évaluées grâce à une station météorologique électronique et stabilisées à 19° C (+ ou – 2° C) et 45 % d'humidité (+ ou – 5 %). Tous ces paramètres ont été relevés et archivés dans un cahier pour chaque membrane produite. Après production, les dernières traces de solvant ont été éliminées par étuvage.

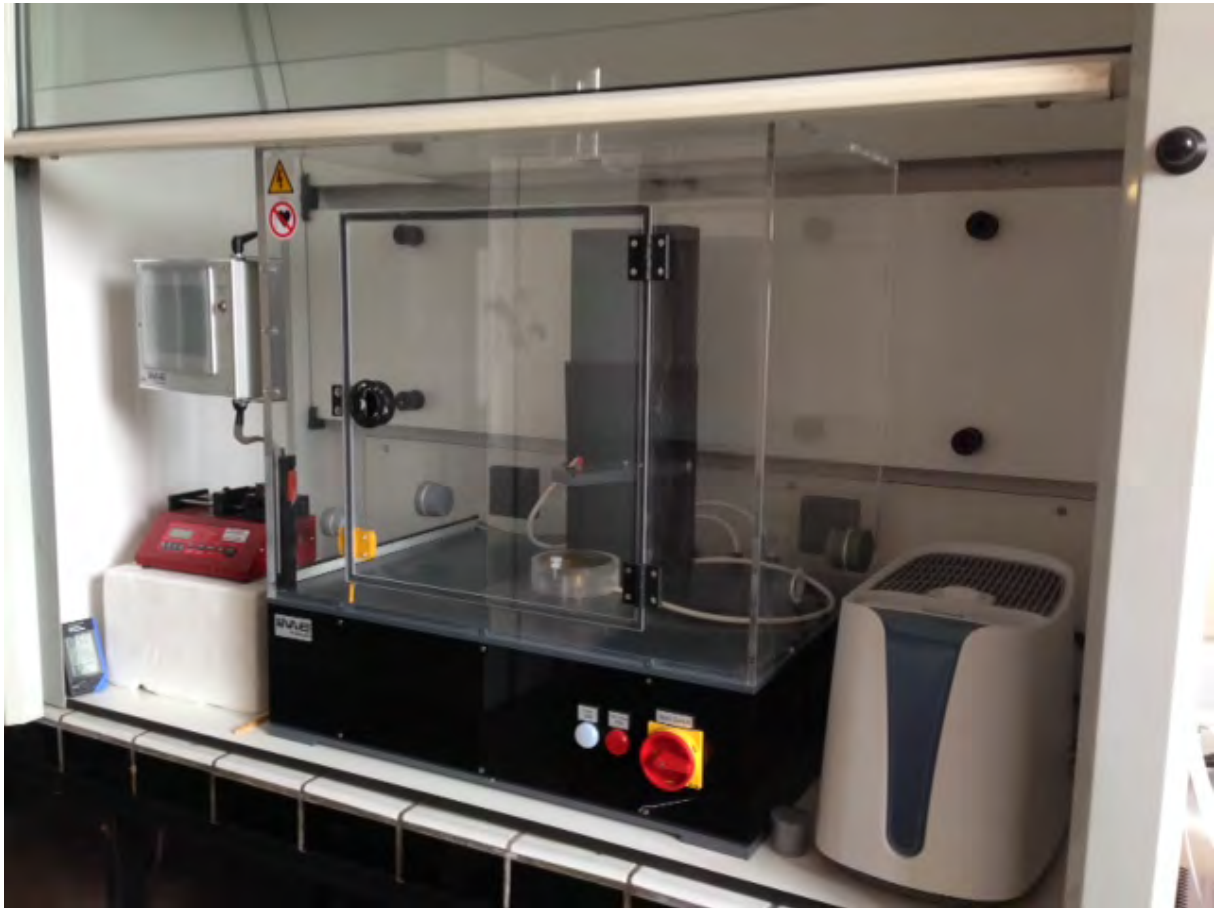


Figure 15 : Appareillage standard présent au laboratoire : Electrospinning Apparatus EC-DIG (IME Technologies). (Photo : Sandy Eap)

4.1.2 Fonctionnalisation des membranes par la méthode des multicouches de polyélectrolytes

4.1.2.1 Préparation des membranes

Les membranes ont été découpées directement sur la feuille d'aluminium à l'emporte-pièce avec un insert de 12 mm de diamètre. La membrane a ensuite été séparée de l'aluminium par un lavage dans de l'alcool à 70 %. Les membranes découpées ont ensuite été placées dans un insert permettant de les stabiliser puis disposées dans une plaque 24 puits. Chaque membrane a ensuite été recouverte de 2 mL de solution tampon et placée à 4° C pendant une nuit (Figure 16).

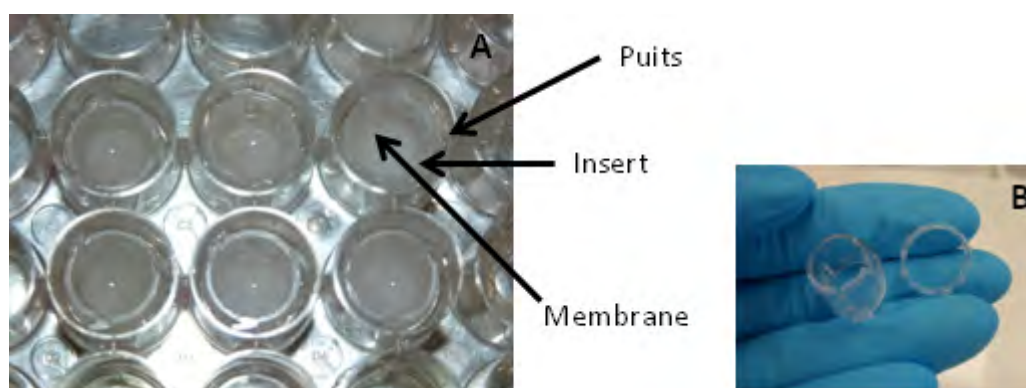


Figure 16 : Image macroscopique de membranes fines de PCL électrospinnées dans une plaque de 24 puits avec un montage sur insert (A). Image d'un insert (B). (Photos : Sandy Eap)

4.1.2.2 Préparation des solutions

Une solution tampon constituée de MES à 40 mM et de NaCl à 150 mM, à pH 5,5 a été utilisée afin de diluer les polyélectrolytes. Cette même solution a été utilisée pour rincer les polyélectrolytes non adsorbés entre chaque dépôt. La solution de polycations était constituée d'un « dendrigraft » de lysine de 4^e génération (DGL-G⁴) dilué dans la solution tampon à la concentration de 0,50 mg/mL. La solution de polyanions était constituée du facteur de croissance NGF dilué dans le même tampon à la concentration de 600 ng/mL ou de BSA à 1 % comme témoin.

4.1.2.3 Préparation des nanoréservoirs

La technique des multicouches de polyélectrolytes permet d'adsorber des nanoréservoirs à la surface des fibres de la membrane. La taille et le nombre des nanoréservoirs sont fonction du nombre de bicouches déposées, une bicouche est constituée d'une couche de DGL-^{G4} et de NGF notée (DGL-^{G4}/NGF).. La solution tampon a été remplacée par 300 μ L de solution de DGL-^{G4} puis un rinçage a été effectué avec 2 mL de solution tampon. Trois-cents μ L de solution de NGF ou de BSA ont ensuite été déposés sur la membrane. Un dernier rinçage avec la solution tampon a été réalisé. Ces étapes permettaient le dépôt d'une bicouche. . Les temps d'incubation de toutes les solutions sont de 15 minutes, il fallait donc une heure pour déposer une bicouche. La procédure a été répétée en fonction du nombre de bicouches désiré. Les nanoréservoirs ont été nommés en fonction du nombre de bicouches. Dans notre expérience, 3 ou 6 bicouches ont été déposées ce qui a permis d'obtenir des nanoréservoirs (DGL-^{G4}/NGF)₃, (DGL-^{G4}/NGF)₆ et (DGL-^{G4}/BSA)₃.

Après le dépôt de la dernière bicouche, la dernière solution a été remplacée par du milieu de culture sans sérum afin d'équilibrer le pH. Les plaques ont ensuite été placées dans un incubateur pendant la nuit.

4.1.3 Caractérisation des membranes au microscope électronique à balayage (MEB)

4.1.3.1 Préparation des échantillons

Après avoir été découpées, les membranes non fonctionnalisées ont été collées sur un porte-échantillon grâce à un ruban adhésif conducteur au carbone. La métallisation a ensuite été réalisée avec un métalliseur Cressington 108 auto/SE. La métallisation se faisait sous argon avec de l'or/palladium.

Les membranes fonctionnalisées ont dû être traitées avant d'être métallisées. Elles ont tout d'abord été fixées grâce à une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % diluée dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Puis elles ont été

déshydratées par des bains successifs de vingt minutes dans de l'éthanol à concentration croissante (25 %, 50 %, 75 %, 90 %, et 100 %). Après le dernier bain, les membranes ont été placées dans le HMDS pendant trois minutes. Finalement, les membranes ont été placées dans un dessiccateur pendant trente minutes pour être séchées. Elles ont ensuite été montées sur le porte-échantillon puis métallisées (Figure 17).



Figure 17 : Métalliseur Cressington 108auto/SE associé à une pompe Duo Line (Photo : Sandy Eap)

4.1.3.2 Observation au MEB

Le MEB était un Hitachi TM-1000 (Tokyo, Japon). L'observation allait permettre de mettre en évidence d'éventuels défauts de structure des membranes qui sont alors exclues. Après enregistrement des images, le logiciel Image J a permis de mesurer le diamètre des fibres ou la taille des pores.

4.2 Cultures cellulaires et d'organes

4.2.1 Les germes de 1^{re} molaire mandibulaire de souris

4.2.1.1 Prélèvement des germes

Les souris gestantes ont été sélectionnées lorsqu'elles étaient au 14^e jour de gestation. Elles ont été mises à mort par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (CEVA santé animal, Centravet, Nancy, France) avec une dose de 0,1 mL/10g. Une dislocation cervicale a complété cette procédure. Les embryons ont été sortis de leur poche utérine grâce à des micro-pinces chirurgicales puis placés dans une boîte de Petri en verre posée sur de la glace. Les embryons ont ensuite été sortis de leur poche utérine grâce à des micro-pinces chirurgicales. Chaque tête a ensuite été prélevée et placée dans du milieu de culture DMEM-F12 (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). Le prélèvement des germes s'effectuait sous stéréomicroscope à l'aide de bistouris lame 10. La mandibule a été séparée du reste de la tête puis les deux germes (droit et gauche) de la première molaire mandibulaire ont été prélevés et placés dans du milieu de culture (Figure 18).

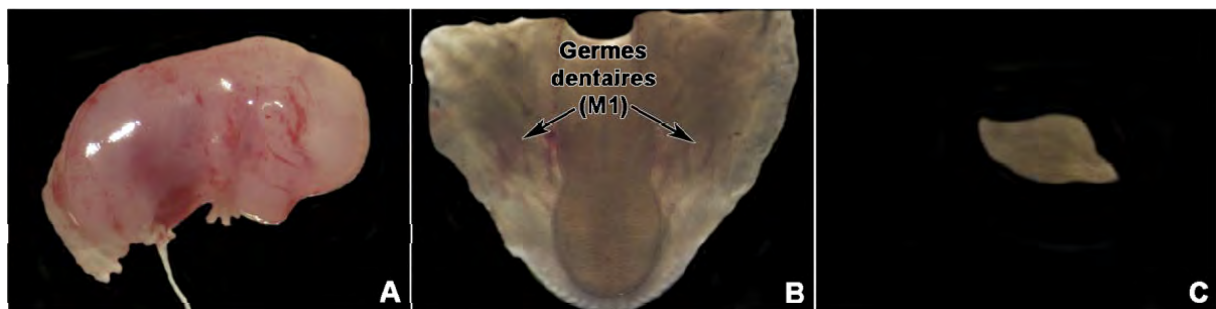


Figure 18 : Embryon de souris au 14^e jour embryonnaire (A), de la mandibule après dissection avec mise en évidence des deux germes de première molaire mandibulaire (B) et de germe de molaire après dissection. (Photo : Tunay Kökten)

4.2.1.2 Culture des germes

Les germes ont été cultivés sur un milieu semi-solide dans un incubateur à 37° C et dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂. Le milieu était composé de DMEM-F12 (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) supplémenté de 20 % de FBS (PAA, Les Mureaux, France), 0,10 mg/mL d'acide ascorbique (Merck, Lyon, France),

de 50 U/mL de pénicilline-streptomycine (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), de 2 mM de L-Glutamine (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) et de 0,36 % d'agar (Sigma-Aldrich, Lyon, France) permettant la gélification. Les germes ont été placés dans une nouvelle boîte tous les 2 jours afin de changer le milieu.

4.2.2 Culture d'ostéoblastes primaires de souris

4.2.2.1 Origine des cellules

Les ostéoblastes primaires de souris ont été obtenus à partir de l'os pariétal de souris ICR adultes. Après la mise à mort, les deux os pariétaux ont été découpés en petits morceaux à l'aide d'une paire de ciseaux chirurgicaux. Les morceaux ont ensuite été rincés dans du PBS puis traités avec une solution de PBS contenant de la collagénase (50 $\mu\text{g/mL}$) et de la fungizone (5 $\mu\text{g/mL}$) pendant 40 minutes à 37° C.

4.2.2.2 Culture des ostéoblastes

Après un rinçage au PBS, les morceaux ont été cultivés en boîtes de Petri à 37° C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ dans du milieu de culture DMEM supplémenté de 50 U/mL de pénicilline-streptomycine (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), 5 $\mu\text{g/mL}$ de fungizone, 1 % de pyruvate de sodium, 0,1 % d'acide ascorbique (Merck, Lyon, France) et 10 % de FBS (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). Le milieu de culture a été changé au bout de quatre jours. La sortie des ostéoblastes des morceaux d'os a été confirmée par microscopie optique. Ces cellules ont ensuite été cultivées en flasques de 75 cm² et le milieu de culture a été changé tous les 3 jours.

4.2.3 Prélèvement des ganglions trijumeaux (TG)

Les ganglions trijumeaux ont été prélevés sur des souris 2 à 3 jours après la naissance. La mise à mort a été effectuée par décapitation à l'aide d'une paire de ciseaux chirurgicaux. La peau a été découpée du crâne puis la tête a été fixée sur un support en polystyrène à l'aide de deux aiguilles. La suite de la procédure s'est passée sous stéréomicroscope opératoire. La calotte crânienne a été découpée afin de mettre en évidence le cerveau. Ce dernier a été délicatement retiré à l'aide d'une spatule. Les deux ganglions trijumeaux (TG) étaient situés de part et d'autre de l'axe médian (Figure 19B). Ils étaient aisément identifiables grâce aux trois nerfs (optique, maxillaire et mandibulaire) qui en sortent vers l'avant. Les TG ont été prélevés à l'aide de deux bistouris en les découpant en avant et en arrière afin de les désolidariser des autres structures anatomiques. Les TG ont ensuite été placés dans du milieu de culture DMEM-F12 (Figure 19).

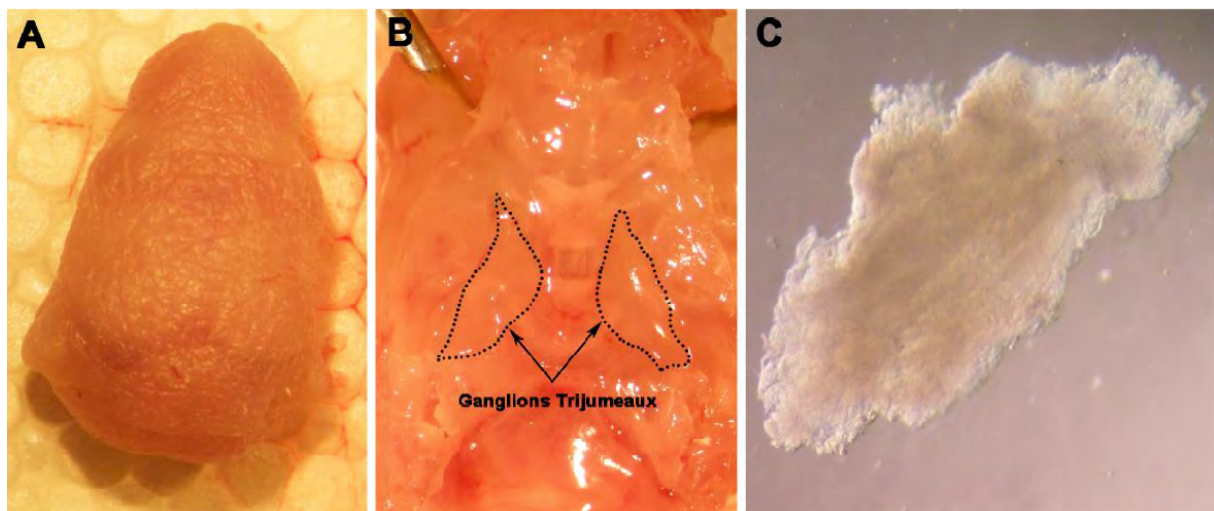


Figure 19 : Tête de souris PN 2-3 (A), de la localisation des ganglions trijumeaux après dissection et d'un ganglion trigéminal prélevé (Photo : Tunay Kökten)

4.3 Caractérisation *in vitro*

4.3.1 Culture des ostéoblastes

Les ostéoblastes ont été cultivés pendant 14 jours sur les membranes en PCL en plaque de culture.

4.3.1.1 Étude de l'expression des protéines osseuses

Le protocole de marquage était le suivant :

- Fixation avec du paraformaldéhyde (PFA) 4 % dilué dans du PBS pendant 1 h en incubateur à 37° C,
- Trois rinçages successifs au PBS,
- Incubation dans une solution de perméabilisation et de saturation composée de 0,1 % de TritonX-100 et de 1 % de BSA durant 45 minutes à température ambiante,
- Trois rinçages successifs au PBS,
- Marquage à la phalloïdine pendant 20 minutes à température ambiante,
- Trois rinçages successifs au PBS,
- Incubation avec l'anticorps primaire pendant 2 h à température ambiante ou toute la nuit à 4° C (Tableau 1),
- Trois rinçages successifs au PBS,
- Incubation avec l'anticorps secondaire pendant 1 h à température ambiante à l'abri de la lumière (Tableau 2),
- Trois rinçages successifs au PBS,
- Marquage au DAPI pendant 5 minutes à l'abri de la lumière,
- Montage des échantillons sur lame de verre dans du milieu de montage Dako (Dako, Trappes, France).

Les échantillons ont alors pu être observés au microscope à fluorescence Leica DM 4000 B.

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés *in vitro*

Anticorps Primaires	Dilution	Espèce d'origine	Fabricant
Ostéocalcine	1:200	chèvre	Santa Cruz
Ostéopontine	1:200	lapin	Santa Cruz
Ostéonectine	1:200	chèvre	Abcam
Collagène I	1:200	lapin	Abcam

Tableau 2 : Anticorps secondaires utilisés *in vitro* et *in vivo*

Anticorps Seondaires	Dilution	Animal d'origine	Fabricant
Alexa Fluor® 488	1:200	chèvre	Invitrogen
Alexa Fluor® 488	1:200	âne	Invitrogen
Alexa Fluor® 594	1:500	âne	Invitrogen

4.3.1.2 Étude de la minéralisation

La minéralisation a été mise en évidence par la coloration au rouge d'Alizarine. La solution de coloration est constituée de 2 g de rouge d'Alizarine dans 100 mL d'eau distillée. Le protocole de marquage était le suivant :

- Vérifier le pH de la solution. Il devait être compris entre 4,1 et 4,3. Il pouvait être ajusté avec une solution d'hydroxyde d'ammonium,
- Deux rinçages successifs au PBS,
- Fixation à froid à l'éthanol 70 % pendant 1 h à – 20 ° C,
- Trois rinçages à l'eau distillée,
- Incubation pendant 20 minutes dans le rouge d'Alizarine à température ambiante,
- Rinçage à l'eau distillée jusqu'à ce que le surnageant soit clair.

Les échantillons ont ensuite été observés au microscope optique.

4.4 Caractérisation *in vivo*

4.4.1 Préparation des échantillons

4.4.1.1 Stérilisation des membranes

Les membranes ont été stérilisées par un bain d'une heure dans de l'éthanol à 70 %. Puis elles ont été passées sous les UV (254 nm, 30 W) pendant 30 minutes de chaque côté. Elles ont ensuite été rincées deux fois au PBS pour éliminer l'éthanol. Puis elles ont été conservées à 37° C dans du PBS ou du milieu de culture si aucune fonctionnalisation n'était prévue. Dans le cas contraire, elles ont été fonctionnalisées suivant la procédure décrite plus haut.

4.4.1.2 Implant pour la régénération d'une unité os/dent

4.4.1.2.1 Préparation du collagène

Un gel de collagène a été préparé à partir de collagène de type I de queue de rat (Institut de biotechnologies Jacques Boy, Reims, France). Trois millilitres de collagène ont été mélangés avec 5,5 mL de milieu contenant 10 % de FBS, 0,5 mL de NaOH à 0,1 M. En fonction de l'échantillon, 1 mL d'ostéoblastes en suspension à la concentration de $2 \cdot 10^5$ cellules/mL a été ajouté à la solution.

4.4.1.2.1 Préparation des implants

Les implants ont été préparés 30 minutes avant les implantations avec des germes de 1^{re} molaire mandibulaire cultivés au préalable 5 jours sur le milieu semi-solide. Trois implants différents ont été préparés :

- la membrane PCL avec le germe,
- la membrane PCL avec 0,1 mL de gel de collagène sans cellules et le germe,
- la membrane PCL avec 0,1 mL de gel de collagène avec cellules et le germe.

4.4.1.3 Implant pour l'innervation de l'organe dentaire

Après leur prélèvement, les germes de 1^{res} molaires mandibulaires de souris ont été cultivés sur le milieu semi-solide pendant 6 jours. Ils ont été regroupés par groupes de 3 germes et disposés sur des fragments de membranes de PCL. Les ganglions trijumeaux ont été prélevés la veille de l'implantation et coupés en petits fragments (4/ganglion). Un fragment a été déposé sur chaque groupe de germes puis le tout a été replacé dans l'incubateur pendant une nuit. Cette technique permettait de garantir la cohésion entre les germes, le ganglion et la membrane ce qui facilitait l'implantation. Différents types d'implants ont été préparés :

- la membrane PCL non fonctionnalisée avec un groupe de trois germes,

- la membrane PCL non fonctionnalisée avec un groupe de trois germes et un ganglion,
- la membrane PCL fonctionnalisée ((DGL-^{G4}/NGF)₃ ou (DGL-^{G4}/NGF)₆ ou (DGL-^{G4}/BSA)₃) avec un ganglion,
- la membrane PCL fonctionnalisée ((DGL-^{G4}/NGF)₃ ou (DGL-^{G4}/BSA)₃ avec un ganglion et un groupe de trois germes.

4.4.2 Expérimentation animale chez la souris ICR

Toutes les implantations ont été effectuées en sous-cutané derrière l'oreille sur le modèle murin (souris ICR ("imprinting control region")). Toutes les procédures étaient en accord avec la réglementation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous le numéro 01715.01.

4.4.2.1 Implantations

Tous les instruments utilisés lors des implantations ont été stérilisés dans de l'éthanol à 70 %. L'anesthésique utilisé était un mélange de kétamine 100 mg/g (Virbac, Centravet, Nancy, France) et de xylazine 10 mg/g (Rompun 2 %, Centravet, Nancy, France) dilués dans de l'eau distillée stérile. Les souris ont été pesées avant une injection intrapéritonéale d'anesthésique. La dose administrée était de 0,1 mL/10 g. L'anesthésie a été contrôlée par l'immobilité des souris et la non réponse à un stimulus douloureux (patte pincée). Les poils au niveau du site d'implantation ont été coupés à l'aide d'une paire de ciseaux. La zone d'implantation a été désinfectée grâce à une compresse imbibée d'éthanol à 70 %. La suite de la procédure a été effectuée sous stéréomicroscope. Des incisions cutanées ont été réalisées au niveau dorsal en arrière des oreilles (Figure 20).



Figure 20 : Implantation en sous-cutané chez une souris ICR (Photo : Sandy Eap)

La peau a été décollée des muscles dorsaux à l'aide d'une aiguille. Les implants ont ensuite été mis en place. Le côté supportant les germes et/ou les ganglions a été dirigé vers la peau. Les incisions ont ensuite été suturées avec du fil résorbable en Vicryl 6/0. Jusqu'à six échantillons ont pu être implantés sur une même souris. La zone d'implantation a ensuite été nettoyée avec une compresse imbibée d'éthanol à 70 %. Les souris ont été placées sur une plaque chauffante jusqu'à leur réveil puis elles ont été remises dans leur cage. Chaque jour, l'état des souris a été contrôlé.

4.4.2.2 Explantations

Les souris ont été sacrifiées par l'injection d'une dose létale de pentobarbital sodique (0,5 mL ; Centravet, Nancy, France) suivie d'une dislocation cervicale. La peau du dos a été découpée et retournée afin de retrouver les implants sans les endommager. Les implants ont ensuite été fixés selon la méthode de caractérisation envisagée (histologie ou immunofluorescence).

4.4.3 Histologie

Pour l'histologie, les échantillons ont été fixés pendant deux jours dans une solution de Bouin-Hollande. Lorsque les échantillons contenaient des tissus potentiellement minéralisés, une étape de déminéralisation était réalisée. Les échantillons ont alors été plongés dans un bain d'EDTA à 15 % pendant une semaine à 4° C et sous agitation. Les échantillons ont ensuite été inclus dans de la paraffine et coupés au microtome afin d'obtenir des coupes de 7 μm d'épaisseur. Les coupes ont été déparaffinées et colorées au Mallory. Après montage sur lame, les coupes ont été analysées au microscope optique.

4.4.4 Immunofluorescence

Les implants ont été fixés dans du PFA dilué à 4 % dans du PBS pendant une nuit à 4° C. Après trois rinçages au PBS, les échantillons ont été placés dans un moule contenant de l'OCT (TissuTek, Agar Scientific, Saclay, France) pendant 4 h à – 20° C puis durant une nuit à – 80° C. Les échantillons ont ensuite été démoulés et placés dans un cryostat à – 27° C afin d'effectuer des coupes de 10 μm d'épaisseur. Les coupes ont été recueillies sur des lames "superfrost plus". Elles ont été laissées à sécher. Elles pouvaient ensuite soit être stockées à – 20° C ou bien la procédure de marquage pouvait être mise en place. Cette procédure était la même que celle décrite précédemment (chapitre 4.3.1.1). Cependant d'autres anticorps ont été utilisés pour les expérimentations *in vivo* (Tableau 3).

Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés *in vivo*

Anticorps Primaires	Dilution	Espèce d'origine	Fabricant
CD-31	1:100	rat	BD Pharmingen
Ostéopontine	1:200	lapin	Santa Cruz
Nestine	1:200	Chèvre	Santa Cruz
Amélogénine	1:200	lapin	Santa Cruz
Périphérine	1:500	lapin	Abcam

V. Résultats et discussion

5.1 Développement d'implants hybrides nanostructurés pour la régénération de l'unité os/dent

5.1.1 Contexte et objectifs

La perte de l'organe dentaire ainsi que la fonte osseuse associée font partie des situations bucco-dentaires les plus contraignantes à traiter. En effet, la stabilité des prothèses amovibles est compromise et la pose d'un implant peut être contre-indiquée. Les thérapeutiques proposées actuellement aux patients font appel aux techniques de régénération osseuse guidée (ROG). Celles-ci se basent sur l'utilisation de membranes et de substituts osseux. Ce sont ces biomatériaux qui jouent un rôle crucial dans les stratégies de médecine régénérative et d'ingénierie tissulaire. Ils peuvent être modifiés afin d'adapter leurs propriétés biophysiques, biochimiques et biomécaniques. Le principe de base est de placer les cellules dans un environnement ressemblant à celui dans lequel elles évoluent physiologiquement : la matrice extracellulaire (MEC). Celle-ci est principalement composée de protéines avec notamment la famille des collagènes. Le collagène est le polymère le plus abondamment retrouvé dans les tissus. Il forme des fibres d'un diamètre pouvant aller de 50 μm à 500 μm . Afin d'être le plus proche des conditions physiologiques, les membranes utilisées en ROG devront être nanofibreuses. L'une des techniques permettant de les réaliser est l'électrospinning. Cette technique permet la production de « scaffold » utilisable pour une grande quantité de types cellulaires et notamment les cellules osseuses.

Dans cette étude, la stratégie se base sur un gel de collagène et cellularisé associé à une membrane nanofibreuse (semblable à celle employée lors des ROG) à des fins de régénération de l'unité os/dent. Cette membrane constituée de Polycaprolactone (PCL) a été obtenue par électrospinning. Le PCL est un polyester qui se dégrade par l'hydrolyse de sa fonction ester dans des conditions physiologiques. C'est un biomatériau approuvé par la FDA (Food and Drug Administration). Cela permet d'envisager des applications cliniques rapides.

5.1.2 Résultats et discussion

La biocompatibilité de la membrane en PCL a été validée par des tests de culture cellulaire *in vitro* d'ostéoblastes primaires de souris et par une observation au microscope électronique à balayage (MEB). Après quatre heures d'incubation, les cellules ont adhéré à la surface de la membrane. Après 14 jours de culture cellulaire, des analyses en histologie et en immunofluorescence ont permis de mettre en évidence l'expression de protéines spécifiques du tissu osseux (collagène I, ostéocalcine, ostéopontine, ostéonectine) ainsi qu'un processus de minéralisation (rouge d'Alizarine). Ces résultats confirment que la membrane est utilisable à des fins de régénération osseuse ce qui a largement été démontré par l'équipe U 1109 (162–164). Ces études montrent que cette membrane peut être fonctionnalisée par la technique des multicouches de polyélectrolytes (LBL) afin d'y adsorber des nanoréservoirs. Cependant, dans la présente étude, c'est un gel cellularisé de collagène qui a été associé à la membrane afin de permettre la régénération de l'unité os/dent *in vivo*.

Les implantations ont toutes été réalisées en sous-cutané chez la souris ICR pendant 14 jours. Les germes de 1^{res} molaires mandibulaires de souris ont tous été au préalable cultivés 5 jours sur un milieu semi-solide. Plusieurs implants ont été étudiés :

- Tout d'abord, un germe a été directement placé sur la membrane PCL avant d'être implanté. Après explantation, le germe a poursuivi sa croissance mais aucune induction osseuse n'a été observée. La membrane n'entrave donc pas le développement du germe. Il est donc envisageable d'utiliser cette membrane pour l'ingénierie tissulaire de l'organe dentaire.
- Ensuite, un gel non cellularisé de collagène a été placé sur la membrane avant d'y adjoindre le germe. Après explantation, le germe a poursuivi sa croissance mais aucune induction osseuse n'a été observée. Le collagène n'a donc aucune incidence sur le développement du germe ni directement sur l'induction osseuse.
- L'implantation du gel cellularisé avec un germe mais sans membrane ne donne aucun résultat pour ce qui est de l'induction osseuse. La membrane est donc nécessaire car elle permet la cohésion de l'implant.

- Enfin, lorsqu'un gel cellularisé est utilisé pour la confection de l'implant, les résultats montrent l'induction d'une coque osseuse autour du germe. Ce dernier a poursuivi un développement normal. L'histomorphogénèse a suivi son cours avec des odontoblastes et des améloblastes fonctionnels. L'os induit est observable autour de la couronne mais aussi au niveau de la racine. Les cémentoblastes sont en contact avec la dentine radiculaire et semblent commencer à produire du ciment. À ce stade, il est déjà possible d'observer une orientation des fibres de collagène entre l'os et la racine en cours de développement ce qui permet d'envisager la formation du ligament parodontal. L'immunofluorescence permet de confirmer la présence de tissu osseux grâce au marquage avec des anticorps anti-ostéopontine et la vascularisation de la pulpe avec des anticorps anti-CD31. Par contre, aucune innervation de la pulpe n'a pu être mise en évidence.

Dans cette étude, la possibilité de régénérer une unité os/dent *in vivo* dans le modèle murin a été démontrée. Cette stratégie est une piste intéressante pour une future application clinique. Ici, la membrane est indispensable mais joue uniquement le rôle de support permettant la cohésion de l'implant. Cependant, un des intérêts de cette membrane est de pouvoir la fonctionnaliser. La technique des LBL est un des moyens envisageables. Elle permet d'incorporer des molécules actives dans des couches successives de polymères (158,165,166). Le contrôle de la différenciation cellulaire ou de l'inflammation a été montré avec les LBL (167,168). Les LBL ont aussi été utilisées par l'équipe U 1109 pour favoriser la production osseuse (162–164). Il serait donc intéressant de combiner la présente stratégie avec la technique des LBL afin de potentialiser les effets sur la régénération de l'unité os/dent et son innervation. Une fonctionnalisation avec de la BMP-2 ou BMP-7 pourrait permettre d'accélérer la formation osseuse.

Dans la présente étude, les implantations ont été réalisées en sous-cutané. Il serait intéressant de réaliser la même expérience mais plutôt sur un site d'implantation osseux ou maxillo-facial. Dans l'équipe U 1109, des implantations dans l'os pariétal (calvaria) de la souris ont été réalisées (169). Ce site est intéressant car la nature du tissu osseux est proche de celui retrouvé au niveau oral. La formation d'un

ligament parodontal dans certaines zones a pu être mis en évidence. Deux corticales entourent un os spongieux. Ce modèle pourrait permettre de mieux comprendre les facteurs qui sont mis en jeu lors de la croissance de la dent et de son environnement parodontal. Des implantations de germes dentaires ont aussi été réalisées avec succès dans le diastème mandibulaire de la souris entre les incisives et les molaires (113). Cependant, l'épaisseur du tissu osseux est très faible sur ce site, ce qui ne permet pas une réelle intégration de la dent dans l'os. Dans les deux cas, une des principales difficultés est d'orienter correctement le germe, surtout si l'implantation se fait à un stade précoce de développement. Une solution a été proposée par l'équipe de Tsuji. Des réassociations de cellules épithéliales et mésenchymateuses de germes dentaires de souris ont été cultivées avant d'être implantées dans la capsule rénale (126). Après explantation, les germes réassociés avaient poursuivi leur croissance et une gangue osseuse s'était formée au niveau radiculaire. Ceux-ci ont ensuite été réimplantés en site maxillo-facial après avulsion de la 1^{re} molaire mandibulaire de souris. Les résultats ont ensuite montré l'ostéointégration et la poursuite de la croissance des implants jusqu'à la mise en occlusion des dents. Ces résultats prometteurs sont à nuancer. En effet, aucune autre équipe n'est parvenue à reproduire ces expériences. De plus, d'un point de vue clinique, le rapport bénéfice/risque de ce genre d'intervention ne semble pas favorable. Cultiver une dent dans la capsule rénale d'un patient avant de la lui réimplanter est une procédure chirurgicale très risquée alors que des thérapeutiques efficaces et peu dangereuses (prothèses, implants) pour le patient sont à la disposition des praticiens. De plus, il a été tenté ici d'implanter des germes dentaires sur le même site extractionnel sans succès. Systématiquement, il a été impossible de retrouver l'implant après deux semaines d'implantation. Les hypothèses se sont orientées vers un problème de vascularisation de l'implant et vers un impact du système immunitaire de l'hôte. Cette expérience a été réitérée sur des souris traitées à la cyclosporine A qui est un médicament anti-rejet couramment utilisé chez les patients greffés (108). Cette fois-ci, les germes ont pu être retrouvés mais leur potentiel odontogénique avait disparu au profit d'une différenciation vers des cellules productrices de tissu osseux. Ces résultats démontrent la complexité des phénomènes mis en jeu dans la croissance de l'organe dentaire et de son environnement. Une étude complémentaire orientée sur la formation

du ligament parodontal est aussi nécessaire. Il serait intéressant de pouvoir implanter les échantillons sur de plus longues durées afin que la racine puisse poursuivre sa formation. Le modèle de la souris « nude » est à envisager.

5.1.3 Conclusion

Cette stratégie permet d'envisager une application clinique pour le traitement des pertes osseuses et dentaires combinées, que se soit en pratique dentaire classique ou pour des lésions plus vastes après des traumatismes ou des chirurgies maxillo-faciales. Il reste cependant nécessaire de trouver une source cellulaire adéquate pour transposer ces résultats chez l'être humain et de trouver une solution concernant le temps de croissance de l'organe dentaire. En effet, si une dent de souris se développe en quelques semaines, il faut plusieurs années chez l'être humain.

Cette étude n'a pas permis d'innover les germes implantés. Une nouvelle stratégie faisant appel aux LBL a été mise en place afin de répondre à cette problématique.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication internationale dans l'Open Journal of Regenerative Medicine.

5.2 Développement d'implants nanofibreux et fonctionnalisés pour l'innervation de l'organe dentaire

5.2.1 Contexte et objectifs

Dans l'étude précédente, la possibilité de développer une unité os/dent grâce à un implant nanofibreux et cellularisé a été mise en évidence. Cette stratégie a permis *in vivo* la croissance du germe ainsi que celle de son environnement osseux. La formation du ligament parodontal n'a, quant à elle, pas pu être clairement établie. De même, l'innervation de l'implant n'a pas pu être réalisée.

Il est primordial de parvenir à innover les dents régénérées car l'innervation participe à plusieurs fonctions essentielles de l'organe dentaire. L'innervation sensitive est assurée par des neurones présents dans le ganglion trigéminal (TG). Elle permet la nociception, la thermoception ou encore la mécanocception (170,171). La présence des récepteurs Toll dans la pulpe et sur les odontoblastes permet la détection des attaques dues aux micro-organismes (172,173). Ces récepteurs pourraient avoir un rôle dans la mise en route des processus de cicatrisation pulpaire. Des récepteurs aux cytokines sont aussi retrouvés au sein du tissu pulpaire. Ceux-ci jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire de l'organisme à une agression. L'innervation sympathique de la pulpe, quant à elle, provient de neurones présents dans les ganglions cervicaux supérieurs et joue un rôle sur le diamètre des vaisseaux sanguins (174,175).

L'objectif de cette étude a été de parvenir à innover un germe de 1^{re} molaire mandibulaire de souris *in vivo*. Notre stratégie se base sur la même membrane PCL mais fonctionnalisée avec le "Nerve Growth Factor" (NGF) grâce à la technique des LBL. En effet, les récepteurs p75 du NGF ont été mis en évidence dans le tissu pulpaire (176). La source nerveuse choisie est le ganglion trigéminal de souris afin de respecter l'innervation physiologique de l'organe dentaire.

5.2.2 Résultats et discussion

Une première étude *in vitro* a été réalisée afin de valider la membrane comme « scaffold » permettant la culture des germes dentaires. Aucune différence de développement n'a été observée après cinq jours de culture, que se soit directement sur le milieu de culture semi-solide ou bien avec la membrane comme support. L'histogénèse de l'organe dentaire a suivi son cours. En effet, il est possible d'observer les épithéliums internes et externes, le réticulum stellaire, des cuspides avec, à leur sommet, les nœuds de l'émail secondaire. Après dix jours de culture, les odontoblastes ont été considérés comme fonctionnels avec la production de prédentine. Cependant, bien que les améloblastes aient une morphologie allongée, aucune production d'émail n'a été mise en évidence.

Le comportement de nos implants a ensuite été testé *in vivo*. Les germes seuls ou avec la membrane ont été implantés, après six jours de culture *in vitro*, en sous-cutané chez la souris ICR pendant deux semaines. Dans les deux cas, le développement se poursuit avec des odontoblastes et des améloblastes fonctionnels. Le début de la formation de la racine peut être observé. Différents marquages immunohistochimiques ont été réalisés afin de confirmer la présence de vaisseaux sanguins au sein de la pulpe dentaire (anticorps anti-CD31) ainsi que de mieux caractériser les odontoblastes (anticorps anti-nestine) et les améloblastes (anticorps anti-amélogénine).

Ces résultats confirment ceux obtenus dans l'étude précédente. La membrane PCL est un support adéquat pour le développement dentaire, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, l'innervation de la pulpe n'a pas été obtenue. Ceci pourrait être la conséquence du site d'implantation qui ne permet pas le recrutement d'axones. Une implantation des implants en site maxillo-facial et notamment dans l'os mandibulaire à proximité du nerf mandibulaire pourrait faciliter leur innervation, l'implant étant proche de cette source nerveuse. Cependant, aucune des tentatives d'implantation sur un site extractionnel mandibulaire n'a permis le développement des germes. La stratégie s'est donc orientée vers la fonctionnalisation de la membrane avec du NGF grâce à la technique des LBL.

La fonctionnalisation des membranes a été confirmée au microscope électronique à balayage par l'observation des nanoréservoirs formés à la surface des fibres. Les nanoréservoirs ont des formes différentes en fonction des polyélectrolytes utilisés. Dans cette étude, le polycation est le "dendrigraft" de poly-L-lysine. Le polyanion utilisé comme contrôle est la BSA (albumine de sérum bovin) qui donne des nanoréservoirs sphériques. Avec le NGF, les nanoréservoirs ont une forme plus aplatie et moins régulière au niveau des contours. Dans tous les cas, plus le nombre de bicouches augmente, plus les nanoréservoirs sont nombreux et de taille importante.

Aucune innervation n'est observée lorsque les germes sont implantés avec la membrane fonctionnalisée avec du NGF ou de la BSA en sous-cutané pendant deux semaines chez la souris ICR. La membrane seule ne permet pas de recruter des axones sur ce site. Il est donc nécessaire d'associer une source nerveuse à l'implant. C'est le ganglion trigéminal (TG) qui a été choisi. En effet, c'est de celui-ci que sont issus les nerfs innervant physiologiquement les dents. Des implantations ont été réalisées afin de vérifier l'effet des membranes fonctionnalisées sur le TG. Après deux semaines d'implantation en sous-cutané chez la souris ICR, des axones ont poussé dans les membranes fonctionnalisées avec du NGF alors qu'aucune croissance particulière n'a été observée avec le contrôle à la BSA. De plus, un effet dose dépendant a pu être mis en évidence. Les axones ont poussé plus profondément dans la membrane lorsque le nombre de bicouches était plus important.

La dernière expérience concerne l'implantation des germes associés à la membrane fonctionnalisée et à un TG. Avec la BSA, les axones poussent autour du germe mais ne pénètrent pas dans la pulpe. Avec le NGF, les axones pénètrent dans la pulpe jusqu'à la couche sous-odontoblastique. De plus, une co-localisation des axones et des vaisseaux sanguins est observable dans ce qui semble être un paquet vasculo-nerveux qui s'arborise ensuite au niveau des cuspides. Cette configuration est très proche de ce qui est retrouvé physiologiquement.

Dans cette étude, nous sommes parvenus à induire l'innervation physiologique d'un germe dentaire grâce à une méthode innovante associant une membrane nanofibreuse fonctionnalisée avec un facteur de croissance et une source nerveuse. L'équipe U 1109 a déjà utilisé cette technologie pour promouvoir la régénération os-

seuse (162, 163). Cette technique permet, en outre, de n'utiliser qu'une très faible concentration de facteur de croissance lors de la fonctionnalisation (600 ng/mL dans la présente étude). Il serait cependant intéressant de quantifier la quantité réelle de NGF présente dans les nanoréservoirs. De plus, il a été montré ici que l'effet induit par la fonctionnalisation sur les TG était dose-dépendant. Plus le nombre de bicouches est important et plus la croissance axonale est fortement induite. Ici, c'est le nombre de bicouches le plus faible (trois bicouches) qui a permis d'innervier les germes. Ce point est important à souligner car plus la dose de facteur de croissance est faible moins le risque d'effets secondaires est important. Dans le cas de la BMP-2, certains kits commerciaux proposent d'imbiber une membrane de collagène dans une solution contenant jusqu'à 12 mg de BMP-2. Une telle quantité de facteur de croissance peut avoir des effets néfastes comme une ostéolyse ou le développement de métastases osseuses (177,178). De plus, la libération non contrôlée et rapide du principe actif empêche les effets à moyen et long terme sur le tissu cible. La technologie des LBL permet de pallier à ces problèmes grâce aux doses très faibles utilisées lors de la fonctionnalisation et à la libération localisée et contrôlée du principe actif dans le temps.

Dans cette étude, le NGF a été choisi comme molécule active car des récepteurs au NGF ont été identifiés dans la pulpe et notamment au niveau des odontoblastes. Cependant d'autres facteurs de croissance participent à l'innervation de la pulpe tels que le BDNF ("brain derived neurotrophic factor") ou le GDNF ("glial cell line-derived neurotrophique factor") (117). Il serait donc intéressant de tester l'effet de ces différentes molécules actives sur l'innervation des germes dentaires.

Le site d'implantation choisi est éloigné de la sphère maxillo-faciale car il n'a pas encore été possible de maintenir la vitalité d'un implant dans l'os mandibulaire. Cependant, ce site implantaire pourrait permettre de recruter les axones à proximité du nerf alvéolaire inférieur et donc de se passer du TG lors de l'implantation. Des études complémentaires sont nécessaires afin de parvenir à ce résultat.

Dans une autre étude (voir annexes), l'équipe U 1109 a mis en évidence l'influence de l'immunité sur l'innervation des germes dentaires. En effet, il est possible d'innervier un germe chez des souris « nude » en le co-implantant avec un TG

en sous-cutané. Le même résultat a été obtenu chez des souris ICR traitées à la cyclosporine A qui est un médicament antirejet. Ces résultats sont très intéressants car ils permettent de mettre en évidence les mécanismes complexes qui entrent en jeu dans les processus biologiques de l'innervation de l'organe dentaire. Cependant, les applications cliniques restent complexes à envisager. Dans le cadre d'une transplantation faciale, la cyclosporine A a montré un effet bénéfique sur l'innervation du greffon. Cependant, le rapport bénéfice/risque d'un traitement immunosuppresseur pour favoriser l'innervation d'une dent est faible. Notre étude permet d'envisager une solution thérapeutique élégante permettant d'éviter un traitement médicamenteux lourd pour le patient.

Les thérapeutiques actuelles en endodonties se basent principalement sur l'ablation de la pulpe dentaire et sur l'obturation complète du système canalaire. Cette thérapeutique n'est pas conservatrice des tissus vivants mais offre des taux de succès proches des 95 % pour des traitements initiaux (179–181). Cependant, la dent ne peut plus réagir aux agressions extérieures ce qui peut compromettre sur le long terme sa conservation. Le maintien de la vitalité pulpaire fait donc partie des challenges actuels en chirurgie dentaire. Deux stratégies sont actuellement mises en place : le coiffage pulpaire direct et les techniques dites de revascularisation. La présente étude permet d'envisager une évolution dans la mise en œuvre de ces dernières. Le principe de la revascularisation de l'endodonte repose sur sa désinfection et sur le recrutement de cellules souches dans la zone périapicale, cellules qui sont sensées se différencier et s'organiser en une néo-pulpe (55). Bien qu'une recolonisation du canal soit effective, aucune mise en évidence d'un réel tissu pulpaire n'a encore été prouvée. En effet, une étude chez le chien a montré que le tissu minéralisé qui se formait sur les parois internes de la racine était histologiquement proche du ciment (182). Ce serait donc du tissu parodontal qui serait à l'origine de l'épaississement observé radiologiquement lorsque cette thérapeutique est appliquée à l'être humain. De plus, aucun test n'a permis de mettre en évidence une réponse aux tests de sensibilités dentinaires. Notre membrane fonctionnalisée avec du NGF pourrait donc favoriser l'innervation de cette obturation biologique de l'endodonte et donc permettre aux patients de retrouver des sensations physiologiques au niveau de leurs dents après traitement.

La membrane testée a permis le développement d'un germe dentaire de souris physiologiquement vascularisé et innervé mais ce modèle reste éloigné de la clinique. Les différentes sources cellulaires dentaires accessibles chez un adulte ont été décrites précédemment (chapitre 2.2.1). Il reste cependant encore difficile d'orienter leur différenciation vers des odontoblastes producteurs de dentine. De plus, aucun "pool" cellulaire épithélial pouvant induire cette différenciation n'a encore été décrit. Ce sont en effet les interactions épithélio-mésenchymateuses qui sont à l'origine de la formation de l'organe dentaire. L'équipe U 1109 travaille depuis de nombreuses années à la compréhension des mécanismes mis en jeu dans ces interactions en utilisant une technique particulière (107,111–113). Après prélèvement, les deux tissus formant les germes sont dissociés en cellules unitaires grâce à un traitement enzymatique. Un culot de chaque type cellulaire est ensuite mis en contact sur du milieu semi-solide. Après quelques jours de culture de nouvelles interactions cellulaires se sont formées jusqu'au développement d'une nouvelle dent : c'est la technique des réassociations. Elle a déjà été utilisée par l'équipe U 1109 afin de tenter d'induire un potentiel odontogénique dans différents "pools" cellulaires de lignées mésenchymateuses (109). Cependant, le rendement de cette technique est faible car les culots sont faits à l'aide d'aiguilles ce qui rend la procédure non reproductible et très opérateur dépendante. Il est donc nécessaire de développer une nouvelle technique permettant d'obtenir les mêmes résultats mais de façon plus systématisée et fiable. Les premiers résultats seront développés dans les annexes.

5.2.3 Conclusion

Dans cette étude, un implant composé d'une membrane électrospinnée nanofibreuse fonctionnalisée avec des nanoréservoirs contenant du NGF permettant l'innervation d'un germe dentaire a été développé. Cette stratégie a été validée *in vitro* et *in vivo*. Ce travail permet d'envisager des applications cliniques en association avec les techniques de revascularisation déjà décrites dans la littérature. Des études complémentaires sont nécessaires afin de valider cette stratégie. Il serait intéressant de parvenir à réaliser l'expérimentation en site maxillo-facial et de tester d'autres facteurs de croissance neurotrophiques.

Résultats et discussion

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication internationale avec "impact factor" dans *Advanced Healthcare Materials*.

VI. Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail a été de développer un biomatériau fonctionnalisé à des fins de régénération dentaire. La stratégie est basée sur l'utilisation d'une membrane nanofibreuse en PCL obtenue par électrospinning et par sa fonctionnalisation.

Une première étude a porté sur le développement d'une unité os/dent. En effet, la dent et son environnement sont deux entités qui ne peuvent exister l'une sans l'autre. Il est donc primordial de parvenir à les régénérer de façon concomitante. Les échantillons étaient constitués d'une membrane recouverte d'un gel de collagène cellularisé avec des ostéoblastes primaires de souris et d'un germe dentaire. Après deux semaines d'implantation en sous-cutané chez la souris ICR, le développement du germe dentaire et de tissus osseux a été obtenu. Cependant aucune innervation du germe n'a pu être mise en évidence.

Une deuxième étude a été mise au point afin de parvenir à ce résultat. La membrane a ici été fonctionnalisée par des nanoréservoirs grâce à la technique des LBL avec du NGF. Après deux semaines d'implantation en sous-cutané chez la souris ICR, l'innervation du germe dentaire a été observée.

Ainsi, avec un même biomatériau, le développement d'une unité os/dent et l'innervation du germe dentaire a été obtenu. Cependant ces résultats n'ont pas été observés lors des mêmes expérimentations.

De nombreuses perspectives s'ouvrent à la suite de ce travail :

- L'association des deux stratégies développées ici pourrait permettre d'obtenir une unité os/dent innervée. Cela permet d'envisager une réimplantation en site maxillo-facial afin de combler un édentement.
- L'implantation directement en site maxillo-facial pourrait permettre de recruter les ostéoblastes et les axones directement au niveau des tissus environnants.
- D'autres facteurs de croissance comme le BDNF ou le GDNF sont à envisager pour favoriser l'innervation de la dent.
- Il serait intéressant de caractériser le type de fibres nerveuses présentes dans les dents régénérées grâce à la technologie présentée ici.

Conclusion générale et perspectives

- Il serait aussi intéressant de tester la membrane sur des cellules souches humaines d'origine dentaire afin d'envisager des applications cliniques, notamment en association avec les techniques de revascularisation.

Ce travail ouvre de nouvelles perspectives quant à l'utilisation de biomatériaux fonctionnalisés pour la régénération de l'organe dentaire. La stratégie développée ici pourrait permettre d'envisager de nouvelles thérapeutiques qui vont améliorer la prise en charge des patients.

VII. Annexes

ANNEXE N°1 : Réassociations épithélio-mésenchymateuses de poumons, reins et glandes salivaires

3D micro-culture allowing salivary gland, lung or kidney tissue formation

Sabine Kuchler-Bopp^{1,2*}, Thibault Bécavin^{1,3}, Tunay Kökten⁴, Nadia Messaddeq⁵, Hervé Lesot^{1,2}, Etienne Deveaux³, Nadia Benkirane-Jessel^{1,2}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche UMR 1109, team “Osteoarticular and Dental Regenerative NanoMedicine”, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

2 Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

3 Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Lille, Lille, France

4 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U954-NEGRE (Nutrition-Génétique et Exposition aux risques environnementaux) Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France

5 Service de Microscopie Electronique, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM Unité U 964, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 1704, Université de Strasbourg, Illkirch, France

* corresponding author : E-mail: kuchler@unistra.fr

Abstract

In this study, we propose an experimental methodology allowing the induction of organ-like structures (i.e. microtissues) formation *in vitro*. Salivary glands (ED 14), kidneys (ED 13) and lungs (ED 13) were harvested on mice embryos. The organs were dissociated into single cells with an enzymatic treatment. The cells were seeded into a special culture plate (InSphero) in order to obtain the formation of microtissues. The evolution of the microtissues was followed on days 2, 3, 4, 8 and 14. Histology and immunohistochemistry showed well-organized epithelial structures (E-Cadherin staining) with persistence of CD31 positive cells and aSMA positive cells. The basal lamina was present around the epithelial structures. These results were confirmed by transmission electron microscopy. Cilia, desmosomes, gap and tight junctions can be observed. All these structures demonstrated the well epithelial organization. The presence of Golgi complex and the abundance of secretory vesicles showed the activity of the cells. After 14 days of culture, all markers are still expressed. The microtissues had continued their development and the epithelial structures were comparable to the physiological organ at PN2. This strategy permits to fully control the quantity of seeded cells. Histogenesis can be followed and leads to the start of organogenesis. All types of cells are still present after several weeks. This experimental model improve our knowledge of the organization of different types of organs and can be employed to study physiology, metabolism, toxicology or cellular organization.

Keywords : cell interaction, development, epithelial-mesenchymal interaction, microtissue, spheroid, 3D cell culture.

Short title : Experimental methodology for epithelial-mesenchymal reorganization

Introduction

Tissue engineering is a vast field aiming to fully regenerate functional tissues and organs. Langer and Vacanti [1] proposed a definition for tissue engineering as “an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function”. 2D cell culture has shown its limitation to understand the behavior of cells in an organ particularly by the loss of differentiated phenotype and absence of extracellular matrix. Therefore a functional approach was developed using a 3D cell culture system. The reproduction of such 3D patterns *in vitro* is necessary for cells to fully differentiate, assemble and coordinate to form a coherent microtissue. Hydrogels were used as physiological substrates to replace the *in vivo* ECM [2]. Approaches to 3D culture can be broadly categorized into scaffold-free or scaffold-based culture systems, with scaffolds made from either natural or synthetic materials [3]. The hanging drop method represents an attractive alternative for multicellular tumor spheroids (MCTS) production, because it is mild, can be applied to a wide variety of cell lines, and can produce spheroids of a homogeneous size without the need for sieving or manual selection. The method has applications for basic studies of physiology and metabolism, tumor biology, toxicology, cellular organization and the development of bioartificial tissue [4]. Three-dimensional (3D) *in vitro* models have been used in cancer research as an intermediate model between *in vitro* cancer cell line cultures and *in vivo* tumor. Spherical cancer models represent major 3D *in vitro* models that have been described over the past 4 decades [5, 6]. This method has also been used more recently with human stem cells for cardiac cells therapy [7]. Kelm and Fussenegger in 2004, optimized the technic on other types of cells from liver, heart and cartilage, to form scaffold-free microtissues and discussed how this technology could significantly impact regenerative medicine [8]. Extracellular matrix was produced in the microtissues, which induced and maintained cell differentiation. The hanging drop technology-based 3D co-cultured tumor model between human DLD1 colon cancer cells and murine fibroblasts had shown a different phenotype and gene expression compared to the 2D model [9].

However no organ-like structure formation was reported when using the microtissue technic. The aim of our study was to develop an experimental methodology in order to induce the epithelial-mesenchymal reorganization and the induction of an organ-like structure in mice. We tried to reproduce histogenesis and an early organogenesis as in the physiological conditions. In fact, it is the cell-to-cell communication between epithelial and mesenchymal cells that leads to the growth of organs. Our choice concerned three organs where these interactions are necessary to induce their development: salivary gland, lung and kidney. Indeed, embryonic development of secretory and absorptive organs including the salivary glands, kidneys and lungs depends on a process known as branching morphogenesis [10, 11]. The first stages of development are the recruitment of different cell types and their aggregation into individual tissue. Morphogenesis and differentiation are regulated by the different interactions between epithelial and mesenchymal cells. The transition between morphogenesis and organogenesis is still unclear as for the role of each tissue in these processes. Several studies have shown that there is a transductive shift from the epithelial to the mesenchymal tissue [10-12]. The progression in the understanding of morphogenesis during the last decades allowed development and application to regenerative medicine [13-16]. Thus, it is necessary to have an unique culture method which can induce epithelial-mesenchymal reorganization to compare the results with different tissues.

Materials and Methods

Animals and tissues

All procedures were designed in compliance with the recommendations of the European Economic Community (2010/63/EU) for the care and the use of laboratory animals. Experimental protocol followed current authorization by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” under the number 01715.01. ICR mice (Charles River Laboratories, l’Arbresle, France) were mated overnight and detection of the vaginal plug was determined as Embryonic Day (ED) 0. Pregnant mice were injected with a sub-lethal dose of pentobarbital (Centravet, Nancy, France) and embryos were delivered by caesarean section and decapitated. The mandibular salivary glands were dissected from ICR mouse embryos at ED 14 and the lungs and the kidneys from ICR mouse embryos at ED 13 under a stereomicroscope with scalpels and placed in the DMEM-F12 on ice.

In vitro culture

Just after the dissection, organs were treated with 0.25 % trypsin (BD Bioscience, Pont de Claix, France) and 1.2 U/mL dispase (Roche, Penzberg, Germany) in DMEM-F12 (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) for 25 min at 37° C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂. Then, they were cut into small pieces using 28G needles before single cell dissociation through a 70 µm nylon filter and pelleted by centrifugation at 9000g for 2 min. This procedure was undertaken four times to maximize its efficiency. Cells were count at this stage by using a Neubauer plate: 10.5 10⁴ cells/salivary gland, 12.4 10⁴ cells/kidney and 1.05 10⁶ cells/lung. GravityPLUS™ 3D culture platforms (InSphero AG, Schlieren, Switzerland) were used to culture the microtissues. Each well was filled with a suspension of 6 10⁴ cells in 40 µL of DMEM-F12 culture medium containing 20 % of FBS (PAA, Les Mureaux, France) 0.10 mg/mL of ascorbic acid (Merck, Lyon, France), 2 mM of L-glutamine (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) and 50 U/mL of penicillin/streptomycin (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France). Cultures were performed at 37° C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂. A volume of 15 µL of medium was added in each well every two days. Microtissues were taken after 2, 3 or 4 days of culture with a 100 µL micropipette.

Some microtissues after 3 days were put in GravityTRAP™ plates (InSphero AG, Schlieren, Switzerland) for additional 2 weeks in the same medium as described before.

Histology

For histology, samples were fixed for 24 h in Bouin-Hollande and embedded in paraffin. Serial sections (7 µm) were stained with Mallory's stain. Sections were observed on Leica DM4000B microscope with the following parameters : for X10 magnification gain 2.5, saturation 1.5 and exposition 0.854ms ; for X20 magnification gain 2.5, saturation 1.5 and exposition 4.64 ms ; for X40 magnification gain 2.5, saturation 1.5 and exposition 8.32 ms.

Immunofluorescence

Microtissues and organs were washed in PBS, mounted in Tissue Tek (OCT) (Agar Scientific, Saclay, France) and frozen at -20° C overnight and then stored at -80° C. Serial sectioning (10 µm) was made on a cryostat (Leica, CM3000). Serial sections were rinsed with PBS and fixed for 10 min with 4 % paraformaldehyde at 4° C. After washing three times for 5 min in PBS at room temperature, sections were incubated for 30 min at room temperature in a blocking solution of 1 % bovine serum albumin (BSA) and 0.1 % Triton X100 and then incubated for one night at 4° C with the primary antibodies: rat monoclonal anti-mouse CD31 (1/200, BD Pharmingen, Evry, France) [17], polyclonal rabbit anti-mouse αSMA antibody (1/200, Abcam, Cambridge, MA, USA) [18] polyclonal rabbit anti-mouse Collagen IV (1/500, Abcam, Cambridge, MA, USA), monoclonal rat anti-mouse E-Cadherin (1/500, TaKaRa Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France) and polyclonal anti-mouse Vimentin (1/800, Abcam, Cambridge, MA, USA). Following incubation, sections were washed three times for 5 min each in PBS and incubated in the secondary antibody solution for 1 h at room temperature. Secondary antibodies were: donkey polyclonal anti-rat conjugated to Alexa 488 (1/200, Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) and donkey polyclonal anti-rabbit IgG conjugated to Alexa 594 antibodies (1/500, Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France). Omitting the primary antibody performed negative controls.

After secondary incubation, sections were washed three times for 5 min each in PBS at room temperature. Nuclei were stained with Dapi (Euromedex, Souffelweyersheim, France). After 3 additional washes in PBS, slides were mounted in fluorescence mounting medium (Dako, Trappes, France) and observed with a microscope (Leica DM4000B) equipped for fluorescence with the following parameters: for X10 magnification gain 2.5, saturation 1.5 and exposition 660 ms for Dapi and Alexa 594 and 1.1 s for Alexa 488 ; for X20 magnification gain 2.5, saturation 1.5 and exposition 210 ms for Dapi and Alexa 594 and 660 ms for Alexa 488; for X40 magnification gain 2.5, saturation 1.5 and exposition 160 ms for Dapi and Alexa 594 and 510 ms for Alexa 488.

Transmission Electron Microscopy

The samples were fixed by immersion in 2.5 % glutaraldehyde and 2.5 % paraformaldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), post-fixed in 1 % osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at 4° C and dehydrated through graded alcohol (50, 70, 90, 100 %) and propylene oxide for 30 min each under agitation. Samples were embedded in Epon 812. Semi-thin sections were cut at 2 µm with an ultra microtome (Leica Ultracut UCT), stained with toluidine blue and histologically analyzed by light microscopy. Ultra-thin sections were cut at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined at 70 kV with a Morgagni 268 D electron microscope. Images were captured digitally by Mega View III camera (Soft Imaging System).

Results

Microtissue formation

In this study, we managed to obtain microtissues forming from a suspension of embryonic mesenchymal and epithelial cells in a drop of culture medium with a good percentage of success (Table 1). Indeed for the 3 organs, we obtained microtissues in 90 % of wells. We can make 1.75 SGMT/salivary gland, 2 KMT/kidney and 17 LMT/lung. The first step was to take the salivary glands from ED14 mice embryos and the kidneys and the lungs from ED13 mice embryos (Figure 1A and 1B). The second step was to dissociate the cells of each organ with an enzymatic treatment (Figure 1A and Figure 1Ba1, b1, c1). Then, the cells were seeded in GravityPLUS™ 3D culture platforms (6.10^4 cells/well) (Figure 1A and Figure 1Ba1', b1', c1'). The formation of the microtissues (SGMT for the salivary gland microtissues, LMT for the lung microtissues and KMT for the kidney microtissues) was observed every day before harvesting. At day 0, the cells were visible in suspension in the droplet of medium (Figure 1Ba1', b1', c1'). Under gravity force, the seeded cells fell at the bottom of the droplet of medium, which led to intercellular contacts. This stage can be compared to the recruitment phase during embryonic development. At day 1 (Figure 1Ba2, b2, c2), the cells from lungs and kidneys were forming several small aggregates (Figure 1Bb2, c2). This phase was reached at day 2 for the cells from the salivary glands (Figure 1Ba3). At day 2 (Figure 1Bb3, c3) or 3 for salivary gland (Figure 1Ba4), the cells were forming small spheres called microtissues. In the following days (day 3 and 4), the microtissues integrity was maintained (Figure 1Bb4, c4, a5, b5, c5).

Evidence of epithelial-mesenchymal reorganization

The microtissues were harvested at day 1, 2, 3 and 4. Histology and immunohistochemistry with anti-E-cadherin and anti-vimentin antibodies were undertaken to visualize the different steps of reorganization (Figure 2 A1-A3, B1-B3, C1-C3; Figure 3 B1-B4, D1-D4, F1-F4). After 1 day, epithelial and mesenchymal cells were already grouped (Figure 2 A1, B1, C1). After 2 days, structured organization was already observed for lung and kidney cells (Figure 1Bb3, c3; Figure 2 B2, C2).

Salivary gland cells achieved the same stage at day 3 (Figure 1Ba4; Figure 2A2). During the next 24 hours, the number of organized epithelial structures increased showing further cell organization (Figure 1Ba4, b3, c3; Figure 2 A3, B3, C3; Figure 3B2-B4 D2-D4, F2-F4). Metaphases (Figure 3B1', D1' and C1' arrows), the stage of mitosis in which chromosomes are at their most condensed and coiled stage, were observed after 4 days in culture. Interestingly, endothelial cells, positive for CD31, were still present after 4 days in culture in salivary gland (Figure 3B5), lung (Figure 3D5) and kidney (Figure 3F5) microtissues. In fact, lungs have a role in the exchange of molecules between the inner body and the external environment. The preservation of endothelial cells is therefore possible in our microtissues. α -SMA staining showed a smooth muscular organization around the epithelial structures (Figure 3B4, D4, F4). These cells play a role in the secretory function of the salivary glands and kidneys. In the lung, the same cells are involved in the contraction and dilatation of the bronchioles and the alveoli in order to help the respiratory function. Their presence in our microtissues allows us to assume that we are beyond a simple epithelial-mesenchymal reorganization: a small organ-like structure has been achieved. The basal lamina, as seen after collagen IV staining, formed after 2 days for LMT and KMT and after 3 days for SGMT *in vitro*. The basal lamina remained observable after 4 days (Figure 3B3, D3, F3, B5, D5, F5). Every epithelial structure was surrounded by the lamina showing the polarization of the epithelial cells (Figure 4B'', D'', F'). Transmission electron microcopy showed that the epithelial cell basal pole was oriented towards the exterior of the structure and the apical pole towards the center as in physiological organs (Figure 4A-F). This stage of development was reached after 4 days of culture. The ultrastructure of epithelial and mesenchymal cell organization was conserved during the development of the microtissues, showing well epithelial-mesenchymal organization. Tight junctions could be observed at the apical pole of the epithelial cells (Figure 4B', D', F''' black arrows), desmosomes (Figure 4B'', B'', F'' double black arrowheads) and gap junctions between the cells (Figure 4B''', D''', F'''' black arrowheads). All these structures demonstrated the well epithelial organization. Desmosomes and gap junctions play a role in cell-to-cell communication. Cilia had also been observed (Figure 4B', D', D'', F'' white arrows). They may be involved in the polarization of cells. Secretory activity could be observed by the presence of

Golgi complex (Figure 4B''', D''', F''') and secretory vesicles (Figure 4B', B'', D'', F'' white arrowheads). All these results can be compared to physiological organs by histology (Figure 3A1, C1, E1), by immunohistochemistry for vimentin and E-cadherin (Figure 3A2-A4 C2-C4, E2-E4), for CD31 (Figure 3A5, C5, E5) and for α -SMA (Figure 3A4, C4, E4) and for collagen IV (Figure 3A3, C3, E3, A5, C5, E5). TEM showed that the microtissue histogenesis was comparable to the corresponding organs (Compare Figure 4A with 4B, 4C with 4D and 4E with 4F) particularly for the presence of tight junctions (Figure 4A', C'', E''), gap junctions (Figure 4C'') and cilia (Figure 4C', E').

Long-term 3D culture

To determine whether microtissues could be maintained for a longer time *in vitro*, they were harvested and put in a culture plate with conical wells to allow the culture without attachment and disintegration of the microtissues. The cultures were maintained up to 14 days (Figure 1Ba6, b6, c6; Figure 5A1, B1, C1; Figure 6D, E, F). For all three microtissues, all markers remained expressed (Figure 5A2-A5, B2-B5, C2-C5). The internal epithelial structures were conserved. The microtissues had continued their development (Figure 5). In fact, the epithelial structures were comparable to the physiological organ at PN2 (compare Figure 6A and 6D, Figure 6B and 6D and Figure 6C and 6F).

Discussion

In this study, we showed epithelial-mesenchymal reorganization leading to the start of organogenesis in a microtissue/organ from a suspension of embryological cells which has never been done before. This reorganization is obtained in a basic medium without addition of factors. This experimental methodology allows to fully control the number of seeded cells (6.10⁴ cells/well) and the size of the microtissues/organs is in direct correlation with the number of cultured cells.

Branching morphogenesis is the developmental program that builds the ramified epithelial trees of various organs, including the airways of the lung, the collecting ducts of the kidney, and the ducts of the mammary and salivary glands. The kidney is widely used to study the mechanisms of organogenesis. Its development involves fundamental processes, such as epithelial branching, induced morphogenesis and cytodifferentiation, which are common to the development of many other organs. Although the understanding of how the kidney is assembled is still limited, these studies are beginning to provide insights into the genetic and cellular interactions that regulate early organogenesis [12]. Rosines et al. (2007) described an *in vitro* method of engineering rat kidney-like tissue capable of being implanted on a Transwell filter and cultured in the presence of BSNconditioned media [13]. On the other hand, Ogawa et al. (2013) demonstrated that the full functional regeneration of a salivary gland reproduces the morphogenesis induced by reciprocal epithelial and mesenchymal interactions through the orthotopic transplantation of a bioengineered salivary gland germ as a regenerative organ replacement therapy [15]. Finally, Plosa et al. (2014) demonstrated the functional importance of $\beta 1$ integrin in lung epithelium during both early and late lung development that affect airway branching morphogenesis and epithelial cell differentiation [19]. $\beta 1$ integrin is a part of the family of the cell adhesion molecules as E-cadherin.

For the three organs in our 3D culture conditions, we obtained microtissue/organ formation with an epithelial-mesenchymal reorganization detected by the

localization of E-cadherin and vimentin. Cadherins are a family of transmembranary calcium-dependent glycoproteins, which mediate the intercellular contacts, being involved in the morphogenesis and the maintenance of tissue structures, but also during the growing processes and cellular differentiation [20]. E-cadherin mediates intercellular adhesion at the level of epithelia and is expressed in all the cells of stratified squamous epitheliums except for keratinized cells [21]. At the level of salivary glands, E-cadherin is expressed by acinar and ductal cells, the maximum of reactivity being signaled at the level of basal pole of striated ductal cells [22]. In the SGMT, E-cadherin localization was in the same way in the epithelial cells as in the corresponding organ at ED14: tight junctions at the apical pole of the epithelial cells, desmosomes and gap junctions between the cells. The same localization was observed for both kidney and lung microtissues. The epithelial structures were surrounded by mesenchymal cells positive for vimentin.

α -SMA is not the most phenotype-specific smooth muscle cell (SMC) marker [23] and is a marker for more intermediate cell types, such as myofibroblasts, which can result from the epithelial-mesenchymal transition. Furthermore, the fibroblast cell line showed an expression of α SMA only in 3D co-culture with the cancer cell line A549, thereby indicating a mesenchymal to mesenchymal shift to an even more myofibroblast phenotype [24]. A recent study investigated the immunohistochemical expression of E-cadherin and alpha-smooth muscle actin (α SMA) in 15 cases of pleomorphic adenoma of salivary glands. It shows the constant presence of E-cadherin reactivity at the level of luminal cells that cover the proliferative structures of ductal-cystic type, which gradually disappears to the periphery. At the level of epithelial proliferative solid areas, the reactivity for E-cadherin was inconstant and heterogeneous, while α SMA expression increased. This aspect indicated the involving of epithelial–mesenchymal transition process in the evolution of pleomorphic adenoma [25]. In the microtissues, α SMA was detected after 4 days in 3D culture and always after 2 weeks around the epithelial structures corresponding to (α SMA)-positive myofibroblast cells. Myofibroblasts are fibroblasts endowed with contractile capacities around acini in lung and salivary gland. They play a role in the lung, renal and sali-

vary gland fibrosis and in the plasticity, the migration and the motility of the cells in the connective tissue. They play a role in the secretory function of the salivary glands and kidneys. In the lung, the same cells are involved in the contraction and dilatation of the bronchioles and the alveoli in order to help the respiratory function.

In immunohistochemistry, CD31 is used primarily to demonstrate the presence of endothelial cells in histological tissue sections. In the three organs, CD31 shows the presence of blood vessels surrounded by a basal membrane positive for collagen IV. The organs were fully vascularized. Endothelial cells constitute the barrier between the blood which circulates in blood vessels and walls of these vessels. The normal function of endothelial cells is to protect the health of blood vessels. For example, endothelial cells of the lung arteries make chemical molecules which relax the lung arteries and maintain a very low blood pressure in the lung arteries. The secretory function of the salivary glands is assured by the myo-epithelial cells, the vascular cells, in particular the endothelial cells of the capillaries and the pericytes. Interestingly, endothelial cells, positive for CD31, were present after 4 days in culture in salivary gland, lung and kidney microtissues and still after 2 weeks. But it seems that the cells are not organized in vessels after 3D culture.

The basal lamina, as seen after collagen IV staining, formed after 2 days for LMT and KMT and after 3 days for SGMT in vitro and remained observable after 4 days. Transmission electron microcopy shows clearly that every epithelial structure was surrounded by the basal lamina. The epithelial polarized cells showed that the epithelial cell basal pole was oriented towards the exterior of the structure and the apical pole towards the center as in physiological organs. This stage of development was reached after 4 days of culture. The ultrastructure of epithelial and mesenchymal cell organization was conserved during the development of the microtissues, showing well epithelial-mesenchymal organization. The numerous secretory vesicles show epithelial cell activity.

We believe that this technic allows to obtain an accurate model of histogenesis

leading to organogenesis. It is therefore possible to investigate in vitro the effect of growth factors or pharmaceutical drugs on the development of several types of organs. There is a wide range of applications for our microtissues/organs. This experimental methodology can be employed to study physiology, metabolism, toxicology or cellular organization.

Acknowledgments

The authors want to thank Hervé Gegout for the great histology work and Jean-Luc Weickert for the TEM sample preparations.

Competing interests

The authors declare that no competing interests exist.

Author contributions

SKB and TB were equally involved in the conception and application in all experiments described in this study. NM performed the TEM observations (Figure 4). SKB and TB made all figures. SKB, TB, TK, HL, ED and NBJ discussed the results and prepared the manuscript.

References

1. Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-926. doi: 10.1126/science.8493529
2. Verhulsel M, Vignes M, Descroix S, Malaquin L, Vignjevic DM, et al. (2014) A review of microfabrication and hydrogel engineering for micro-organs on chips. *Biomaterials* 35: 1816-1832. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.021.
3. Knight, E, Przyborski S (2014) Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created *in vitro*. *J Anat* doi: 10.1111/joa.12257.
4. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK (2003) Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 83: 173-180. doi: 10.1002/bit.10655.
5. Rimann M, Laternser S, Gvozdenovic A, Muff R, Fuchs B, et al. (2014) An *in vitro* osteosarcoma 3D microtissue model for drug development. *J Biotech* 189: 129-135. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.005.
6. Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V (2015) Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17: 1-15. doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004.
7. Emmert MY, Wolint P, Wickboldt N, Gemayel G, Weber B, et al. (2013) Human stem cell-based three-dimensional microtissues for advanced cardiac cell therapies. *Biomaterials* 34: 6339-6354. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.034.
8. Kelm JM, Fussenegger M (2004) Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotech* 22: 195-202. doi:10.1016/j.tibtech.2004.02.002.
9. Thoma CR, Stroebel S, Rösch N, Calpe B, Krek W, et al. (2013) A high-throughput-compatible 3D microtissue co-culture system for phenotypic RNAi screening applications. *J Biomol Screening* 18: 1330-1337. doi: 10.1177/1087057113499071.

10. del Moral PM, De Langhe SP, Sala FG, Veltmaat JM, Tefft D, et al. (2006) Differential role of FGF9 on epithelium and mesenchyme in mouse embryonic lung. *Dev Biol* 293: 77-89. doi:10.1016/j.ydbio.2006.01.020.
11. Larsen M, Yamada KM, Musselmann K (2012) Systems analysis of salivary gland development and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2: 670-682. doi:10.1002/wsbm.94.
12. Vainio S, Lin Y. (2002) Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting, *Nature Rev Genet* 3: 533-543. doi:10.1038/nrg842.
13. Rosines E, Sampogna RV, Johkura K, Vaughn DA, Choi Y, et al. (2007) Staged *in vitro* reconstitution and implantation of engineered rat kidney tissue. *PNAS* 104: 20938-20943. doi/10.1073/pnas.0710428105.
14. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, et al. (2010) Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 328: 1662-1668. doi: 10.1126/science.1188302.
15. Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, et al. (2013) Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun* 4: doi:10.1038/ncomms3498.
16. Vamer VD, Nelson CM (2014) Cellular and physical mechanisms of branching morphogenesis. *Development* 141: 2750-2759. doi:10.1242/dev.104794.
17. Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Hu B, Haïkel Y, Lesot H (2008) Vascularization of engineered teeth. *J Dent Res* 87: 1138–1143.
18. Kökten T, Bécavin T, Keller L, Weickert JL, Kuchler-Bopp S, et al. (2014) Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. *Plos One* 9 : e86011. doi: 10.1371/journal.pone.0086011.
19. Plosa EJ, Young LR , Gulleman PM, Polosukhin VV, Zaynagetdinov R, et al. (2014) Epithelial $\beta 1$ integrin is required for lung branching morphogenesis and alveolarization. *Development* 141: 4751-4762.
20. Takeichi M (1995) Cadherins, Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr*

Opin Cell Biol 7: 619–627.

21. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, et al. (1991) Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 139: 17–23.
22. Andreadis D, Epivatianos A, Mireas G, Nomikos A, Pouloupoulos A, et al. (2006) Immunohistochemical detection of E-cadherin in certain types of salivary gland tumours. *J Laryngol Otol* 120: 298–304.
23. Rensen SSM, Doevendans PAFM, Van Eys GJJM (2007) Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 15: 100-108.
24. Ammann A, Zwierzina M, Gamerith G, Bitsche M, Huber JM, et al. (2014) Development of an innovative 3D cell culture system to study tumor-stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. *Plos One* 9 : e92511. doi: 10.1371/journal.pone.0092511.
25. Enescu A, Enescu AS, Florou C, Petrescu F (2014) E-cadherin and α -SMA expression in the epithelial-mesenchymal transition of salivary glands pleomorphic adenomas. *Rom J Morphol Embryol* 55 : 1383-1387.

Table 1 Number of experiments and percentage of formed microtissues for each organ.

	Number of experiments	Total quantity of MTs	Quantity of formed MTs	Percentage of formed MTs
SGMT	12	337	303	89,9
LMT	10	442	398	90
KMT	11	239	215	89,9

Figures

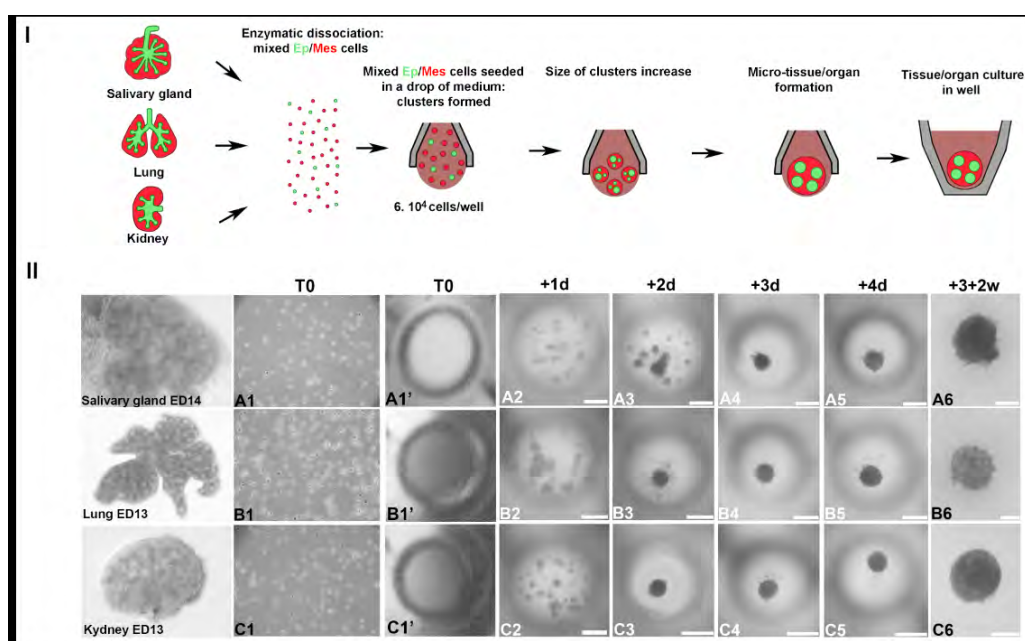


Figure 1. Microtissue formation from dissociated salivary gland (ED14), lung or kidney (ED13) using a drop technic. (A) Organs were harvested and then dissociated in single cells, which were seeded in a drop of medium (6.10^4 cells/well). The epithelial-mesenchymal reorganization occurred during the following days. Small aggregates precipitated in the first days followed by the microtissue formation. **(B)** Optical microscopy of dissociated cells from ED14 salivary gland (**a1, a1'**), ED13 lung (**b1, b1'**) and ED13 kidney (**c1, c1'**) and formation of the corresponding microtissues after 1 day (**a2, b2, c2**), 2 days (**a3, b3, c3**), 3 days (**a4, b4, c4**), 4 days (**a5, b5, c5**) in GravityPLUS™ 3D culture platforms and after 2 additional weeks in GravityTRAP™ plates (**a6, b6, c6**). Bars = 450 mm in a1'-a5, b1'-b5 and c1'-c5 ; 200 mm in a6, b6, c6.

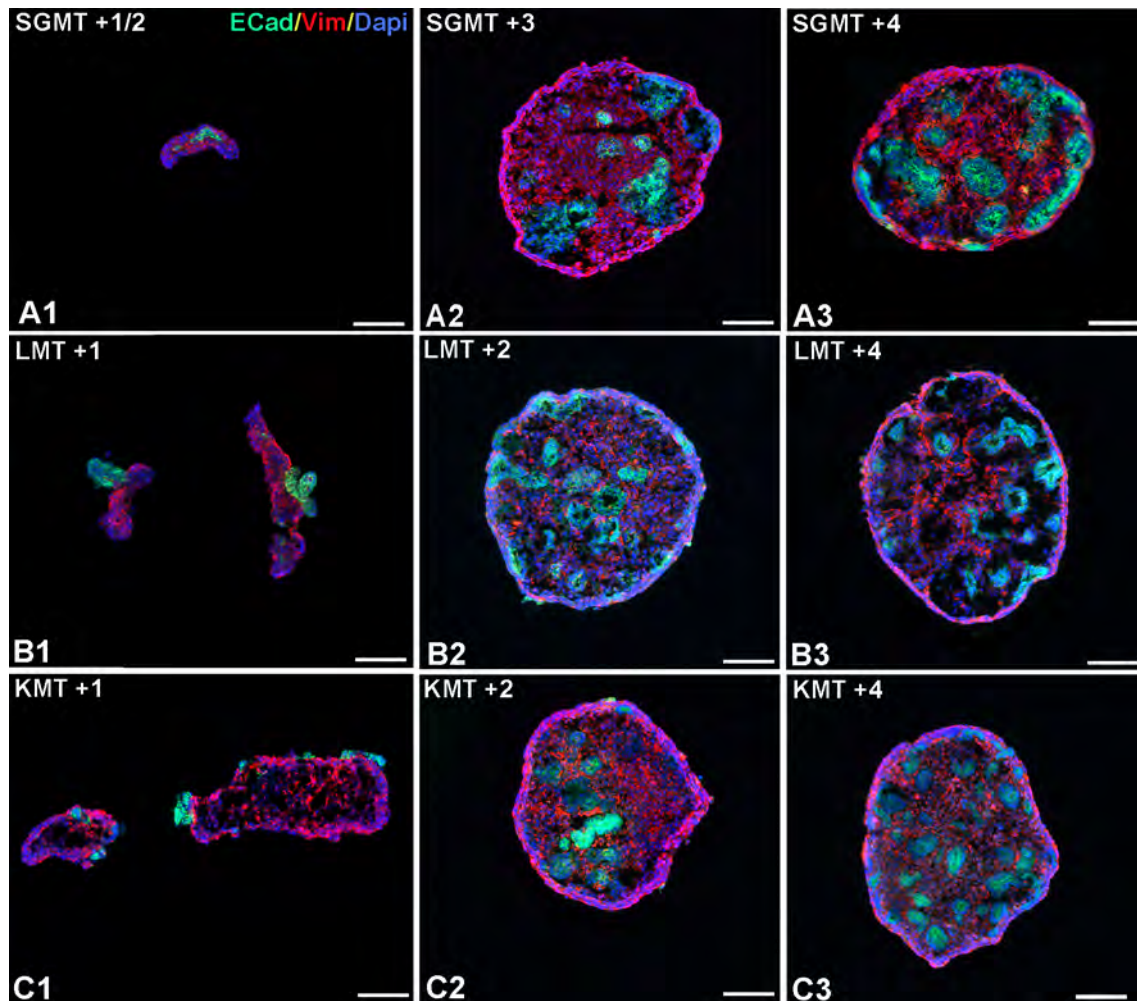


Figure 2. Immunohistochemistry of E-cadherin and vimentin in SGMT (A1-A3), LMT (B1-B3) and KMT (C1-C3) after 1, 2, 3 and 4 days in GravityPLUS™ 3D culture platforms. After 1 day, epithelial and mesenchymal cells were already grouped (**A1, B1, C1**). During the next days, the number of organized epithelial structures increased showing further cell organization (**A2, B2, C2, A3, B3, C3**).

Bars = 100 mm

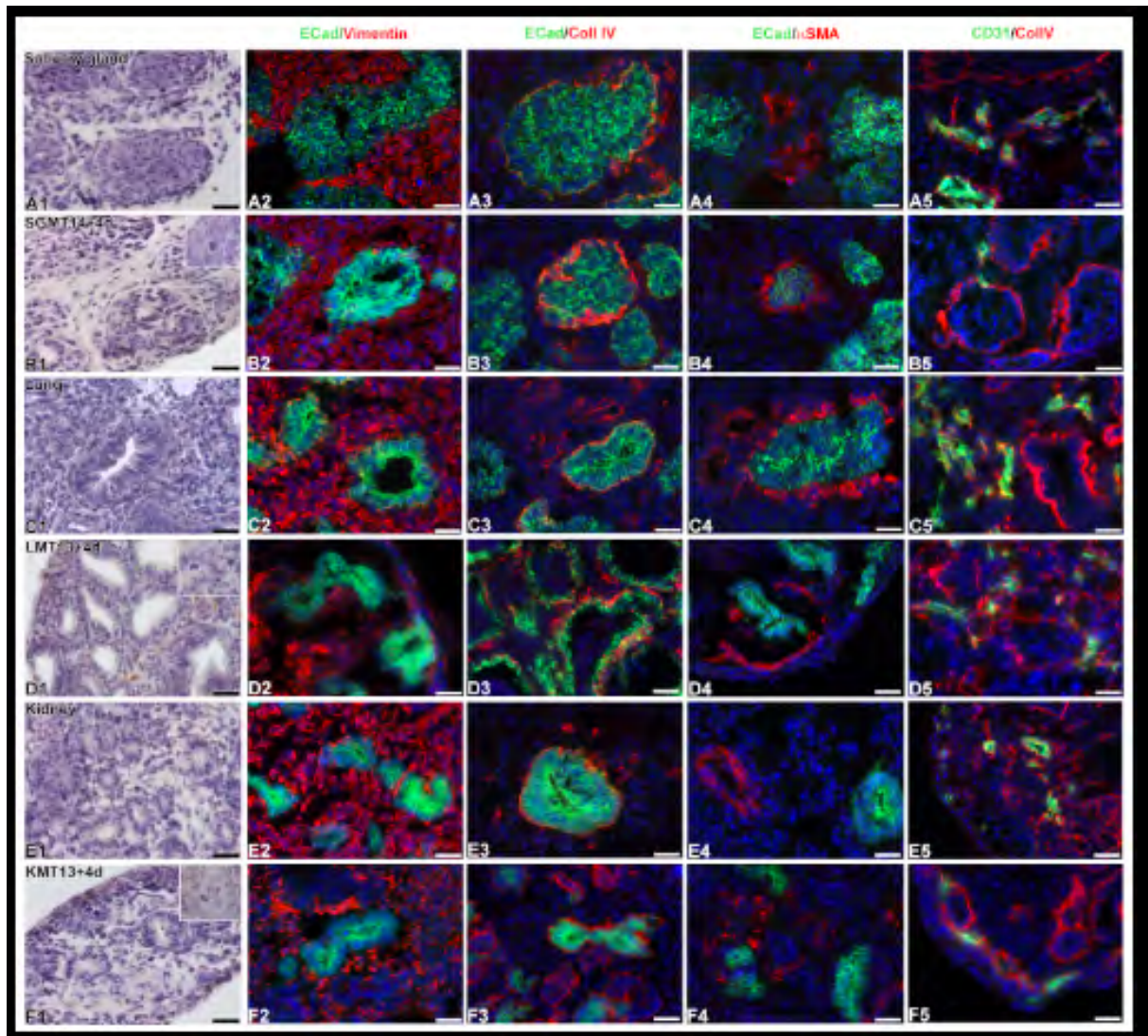


Figure 3. Histology (A1, B1, B1', C1, D1, D1', E1, F1, F1') and immunohistochemistry of E-cadherin (A2-A5, B2-B5, C2-C5, D2-D5, E2-E5, F2-F5), vimentin (A2, B2, C2, D2, E2, F2), collagen IV (A3, B3, C3, D3, E3, F3), aSMA (A4, B4, C4, D4, E4, F4) and CD31 (A5, B5, C5, D5, E5, F5) in salivary gland (A1-A5), SGMT14+4d (B1-B5), lung (C1-C5), LMT13+4d (D1-D5), kidney (E1-E5) and KMT13+4d (F1-F5). E-cadherin is specific for junctions between epithelial cells and Vimentin is specific for type III intermediate filament protein expressed in mesenchymal cells. Collagen IV detect basal membrane and aSMA the smooth muscular organization around the epithelial structures. Arrows in A1, B1', C1, D1' F1' show metaphases, the stage of mitosis in which chromosomes are at their most condensed and coiled stage.

Bars = 25 mm.

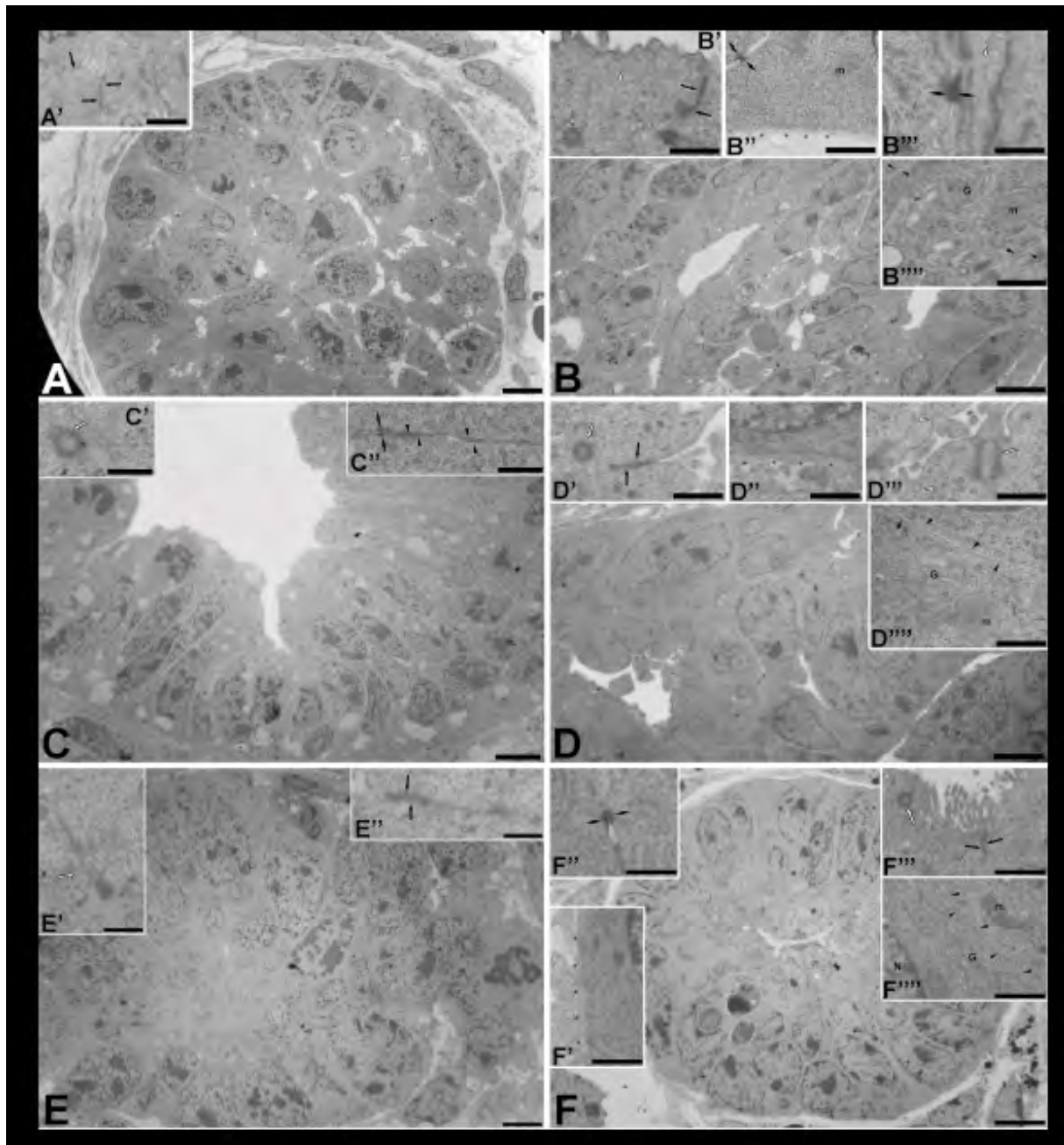


Figure 4. Transmission electron microscopy of salivary gland from ED14 (A), SGMT14+4d (B), lung from ED13 (C), LMT13+4d (D), kidney from ED13 (E) and KMT13+4d (F).

← indicated the tight junctions at the apical pole of the cells (**A', B, D', E'', F'''**),  indicated desmosomes between epithelial cells (**B'', B''', C'', F''**),  indicated gap junctions (**B''', C'', D''', F'''**),  indicated cilia at the apical pole (**B', C', D', D'', E', F'''**),  indicated secretory vesicles (**B', B'', D'', F'''**) and  indicated basal membrane (**B'', D'', F'**). Epithelial cells were organised in acini with a more or less narrow light. For all microtissues, nuclei (**N**) were present in the basal

pole of cells opposite to the apical secreting pole where microvillousities were seen (**B',F'''**). G = Golgi complex, m = mitochondria. Bars = 5 mm in A-F ; 2.5 mm in A' ; 1 mm in B'', D'', F' and F'''and 0.5 mm in B', B'', B''', C', C'', D', D'', D''', E', E'', F'' and F'''.

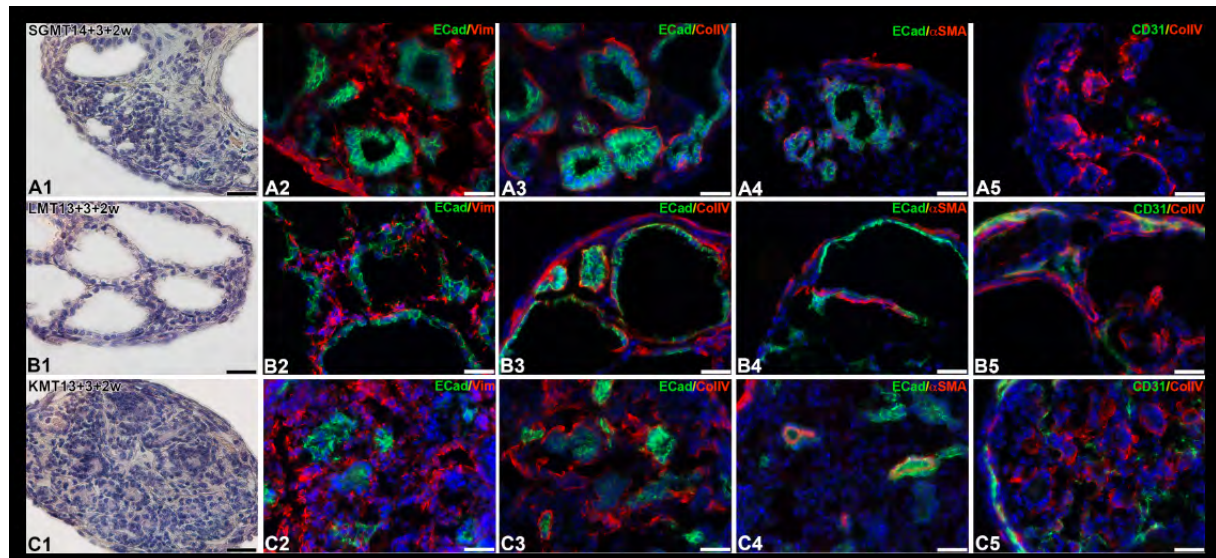


Figure 5. Histology (A1, B1, C1) and immunohistochemistry of E-Cadherin (A2-A5, B2-B5, C2-C5), Vimentin (A2, B2, C2), Collagen IV (A3, B3, C3), aSMA (A4, B4, C4) and CD31 (A5, B5, C5) in SGMT14+3+2w (A1-A5), LMT13+3+2w (B1-B5) and KMT13+3+2w (C1-C5).

Bars = 30 mm.

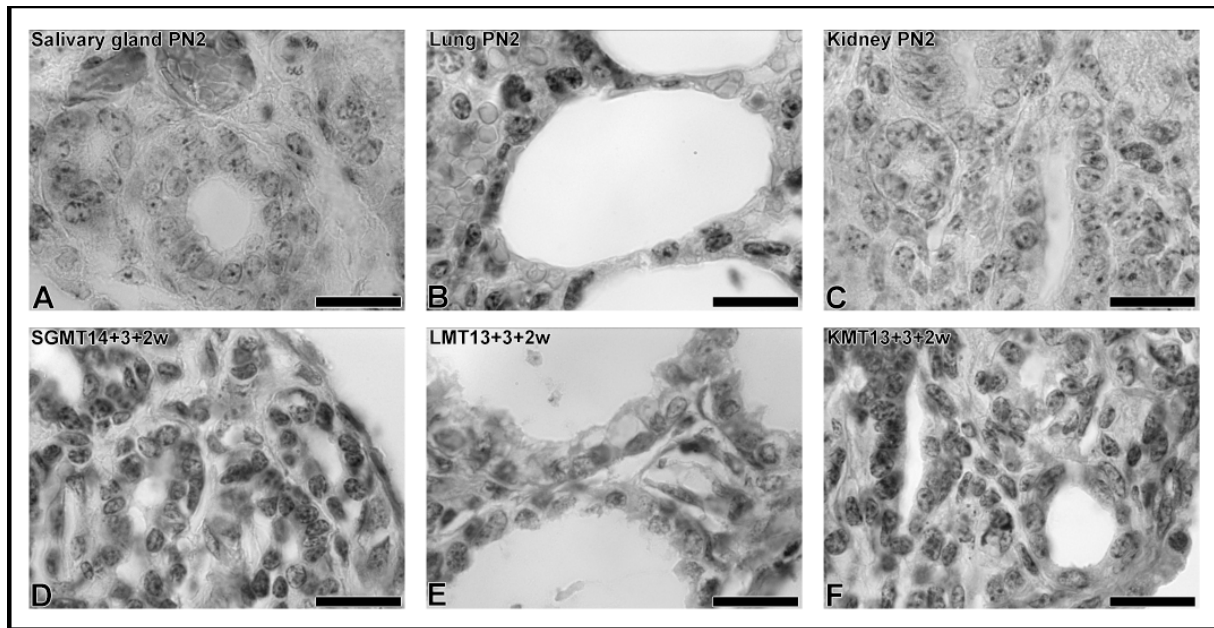


Figure 6. Histology of PN2 salivary gland (A), lung (B) and kidney (C) compared to the corresponding microtissues, SGMT14+3+2w (D), LMT13+3+2w (E) and KMT13+3+2w (F).

Bars = 20 mm.

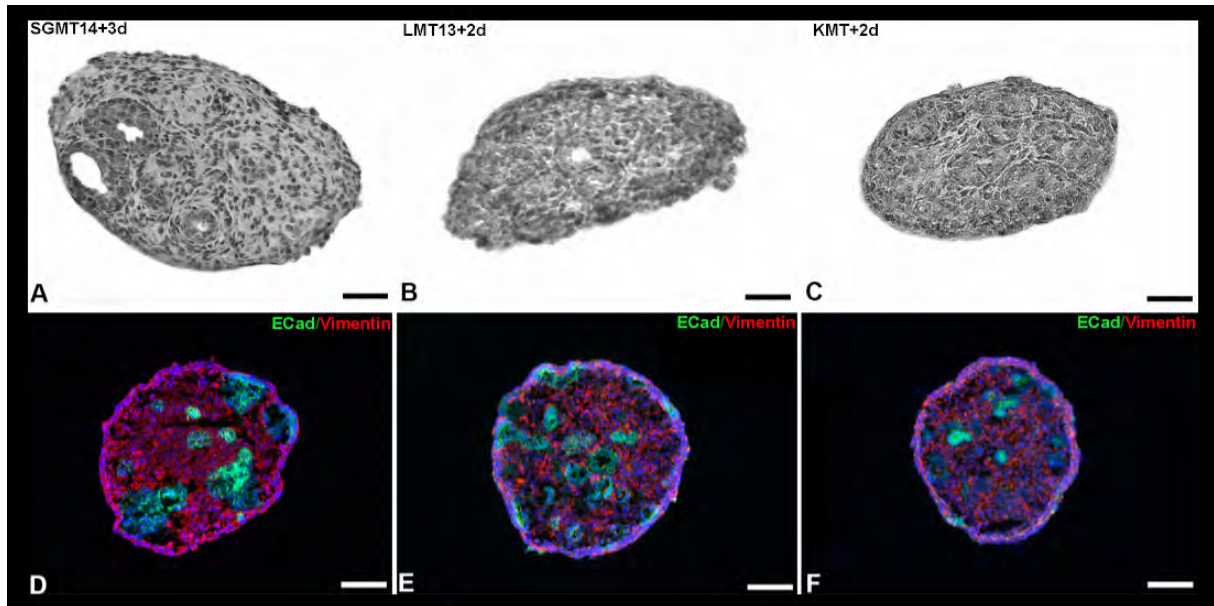


Figure S1: Histology (A,B, C) and immunochemistry (D, E, F) of SGMT at day 3 (A, D), LMT at day 2 (B,E) and KMT (C,F) at day 2. Epithelial organization can already be observed at a early stage of development.

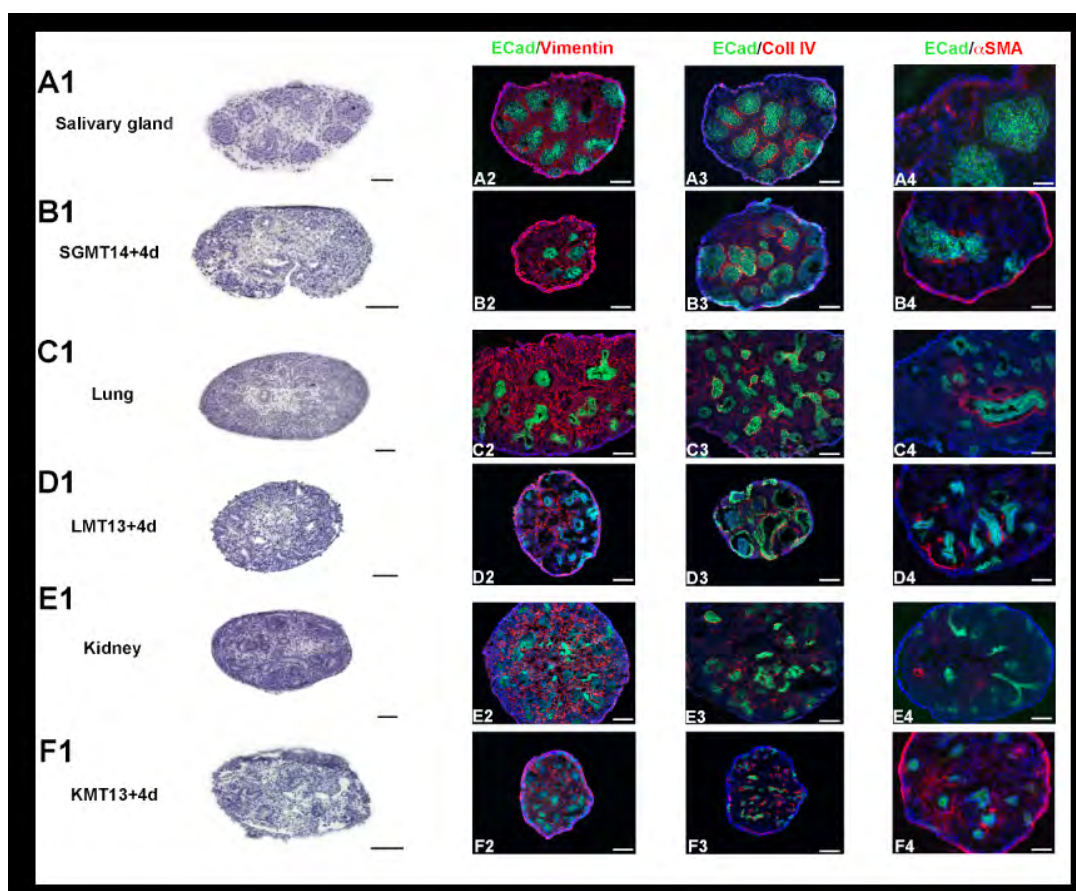


Figure S2: Histology (A1-F1) and immunochemistry (A2-A4, B2-B4, C2-C4, D2-D4, E2-E4, F2-F4) of organs and corresponding MTs at day 4.

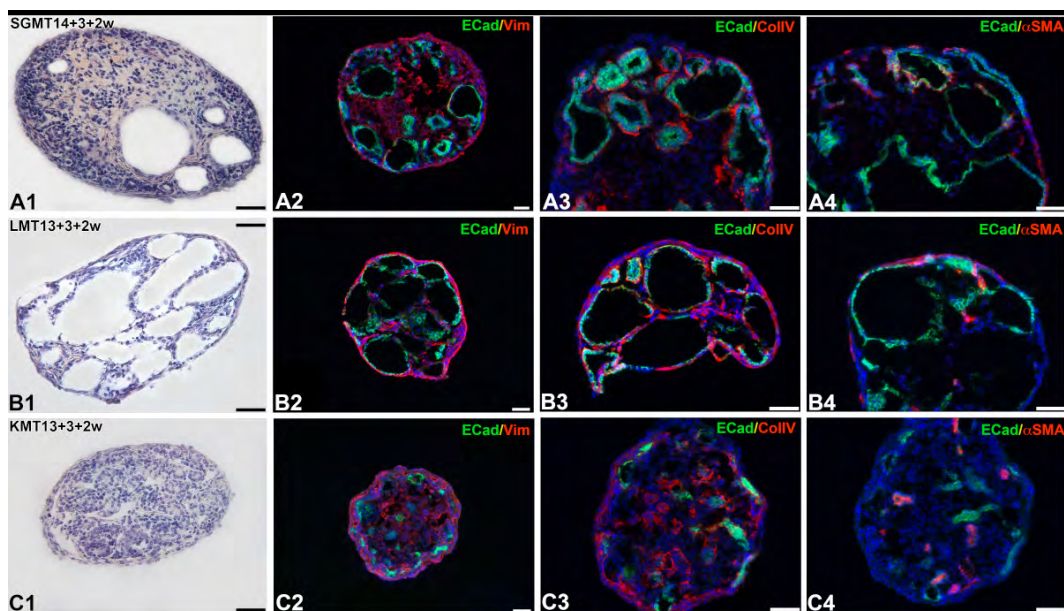


Figure S3: Histology (A1-C1) and immunochemistry (A2-A4, B2-B4, C2-C4) of MTs at day 3 + 2w. Further differentiation can be observed.

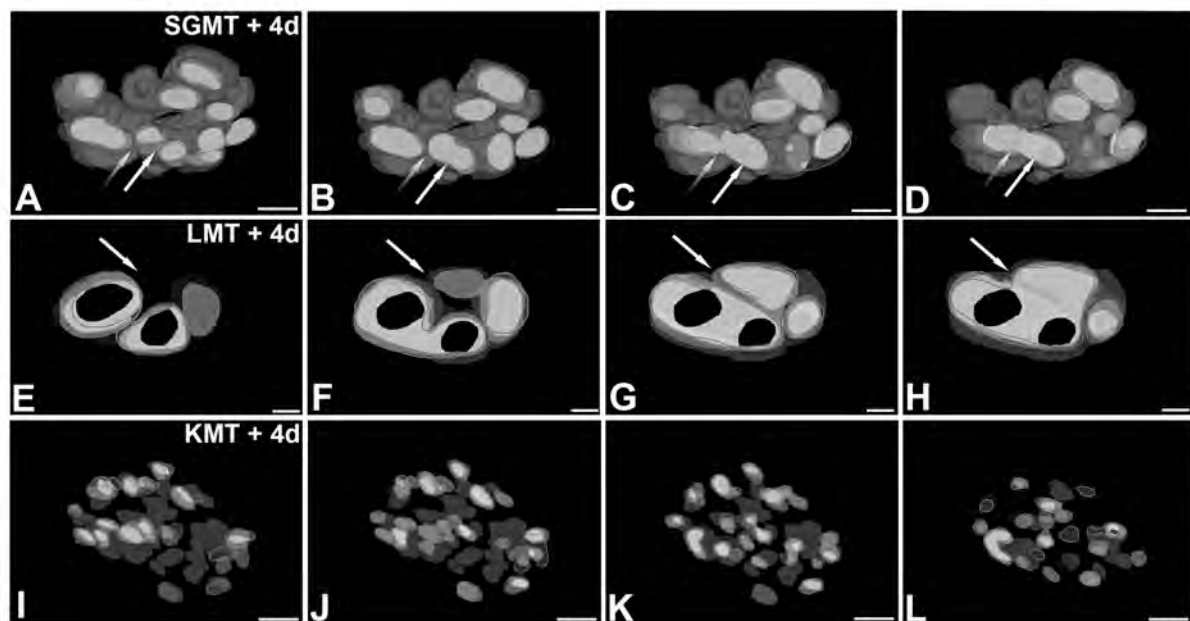
Supporting information

3D imaging

3D imaging was made after histological sections of each organ (lung, kidney and salivary gland) and for each microtissue after 4 days in culture. Serial sections were observed with a microscope (Olympus) equipped with a digital camera DP72. The epithelial structures were drawn on a digital table and saved. Adobe Photoshop CS6 was used to replace each section in the right position in respect to the identified histological structures. The layers were saved in their new position. ImageJ64 was used to obtain the 3D reconstruction (3D viewer plugin).

Connections between the epithelial structures can be followed with the white and grey arrows corresponding to epithelial trees. A complex internal pattern can be observed for the SGMT (**A-D**) and the LMT (**E-H**). For the KMT (**F-I**), we do not observe this complex pattern.

Bars = 100 μ m in A-D and I-L and 25 μ m in E-H.



ANNEXE N°2 : Réassociations épithélio-mésenchymateuses d'organes dentaires

Il a été montré ici que la technique de la culture en goutte permettait d'obtenir des micro-tissus de poumons, de reins et de glandes salivaires. De plus, une réorganisation épithélio-mésenchymateuse à l'intérieur de ces micro-tissus a été mise en évidence. Ce nouveau modèle expérimental permet d'observer le début de l'organogénèse et pourrait permettre d'étudier l'effet de facteurs de croissance ou de médicaments sur le développement de ces organes.

Le but de l'étude suivante est d'appliquer cette technologie à l'organe dentaire et de comparer les résultats avec deux techniques de réassociations épithélio-mésenchymateuses déjà utilisées. En effet, l'organe dentaire, de la même façon que les organes cités plus haut, se développe grâce à l'interaction de l'épithélium dentaire et du mésenchyme dentaire.

La technique utilisée est comparable à celle précédemment illustrée mais se démarque sur un point : l'épithélium et le mésenchyme sont préalablement dissociés (Figure 1).

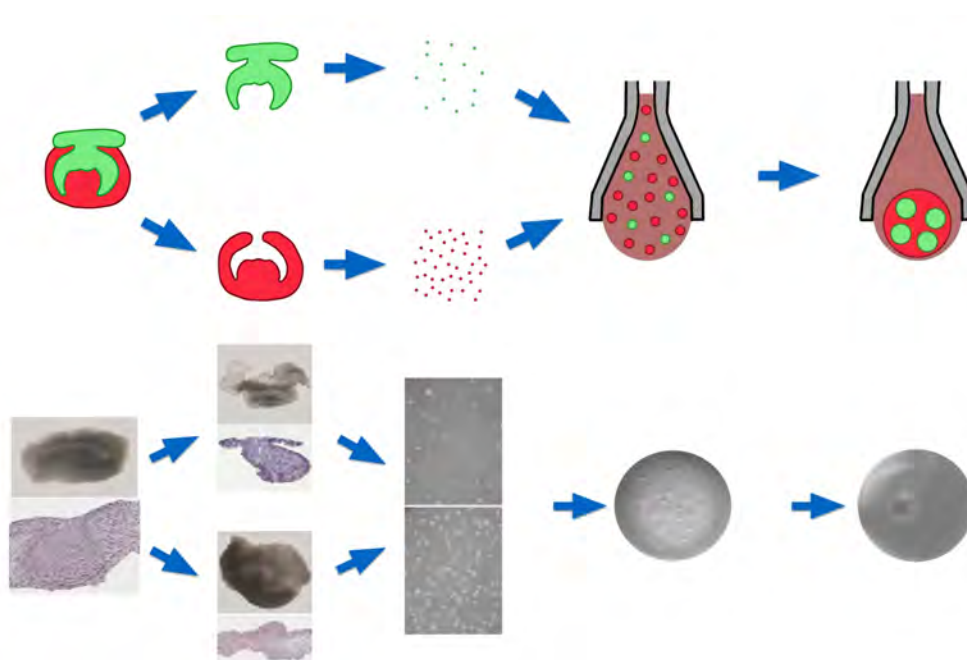


Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes expérimentales. Les tissus épithéliaux et mésenchymateux constituant les germes dentaires sont dissociés avant d'être réassociés à leur tour

en cellules unitaires. Une solution de milieu de culture contenant des cellules épithéliales et mésenchymateuses en proportion physiologique est ensuite injectée dans une plaque de culture spéciale (InSphero) qui permet la formation d'un micro-tissu.

Les micro-tissus ont ensuite été cultivés *in vitro* sur du milieu semi-solide (Figure 2).

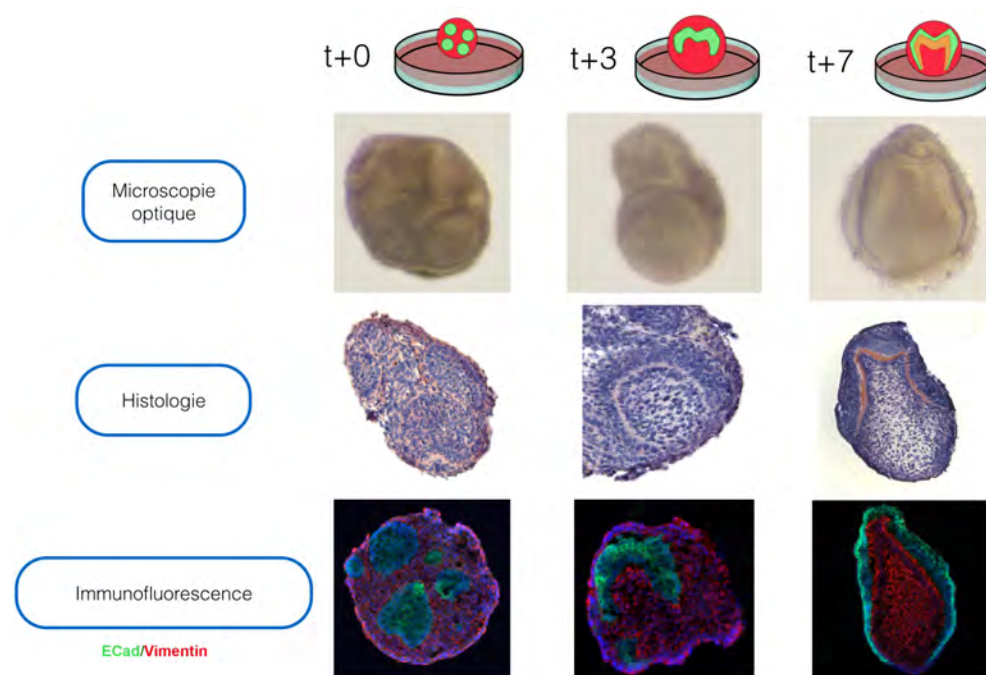


Figure 2 : Microscopie optique, histologie et immunofluorescence des micro-tissus à t0, t+3 jours et t+7 jours.

À t0, une organisation des cellules épithéliales peut déjà être observée. Cette organisation se poursuit jusqu'à prendre la forme d'une cloche à t+3 jours. À t+7 jours, une couronne dentaire est mise en évidence avec des odontoblastes qui semblent être fonctionnels. En effet, de la prédentine est observable en histologie. À ce stade, les améloblastes restent non fonctionnels. Afin de permettre la suite du développement des micro-tissus, ils ont été implantés en sous-cutané chez la souris ICR pendant 14 jours (Figure 3).

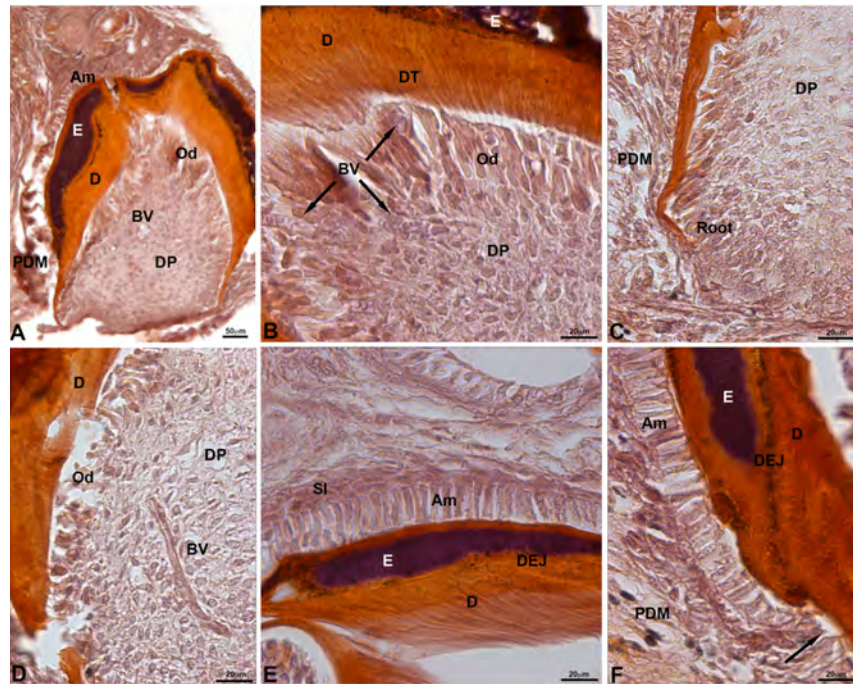


Figure 3 : Histologie des micro-tissus après deux semaines d'implantation en sous-cutané (Am=améloblaste, Od=odontoblaste, E=émail, D=dentine, BV=vaisseaux sanguins, DP=pulpe dentaire, DT=tubuli dentinaires, DEJ=jonction amélo-dentinaire, Root=racine, SI=stratum intermedium, PDM=mésenchyme péri-dentaire)

L'histologie permet de mettre en évidence des améloblastes fonctionnels avec production d'émail, la poursuite de la production de dentine, un début d'édification radiculaire et la vascularisation de la pulpe dentaire. Cependant aucune innervation de la pulpe n'a pu être mise en évidence. Les micro-tissus ont donc été implantés avec un ganglion trijumeau chez la souris "nude" en sous-cutané pendant 14 jours comme cela a déjà été décrit par l'équipe U 1109. Les résultats donnés par l'immunofluorescence permettent d'objectiver l'innervation de la pulpe grâce à un marquage à la périphérie (Figure 4). Un tronc nerveux peut être observé à l'entrée de la pulpe dentaire. Une arborisation nerveuse est ensuite observable au niveau d'une des cuspides dentaires. Ceci est comparable à ce qui est retrouvé physiologiquement. Le grossissement permet de montrer plus précisément l'innervation de la couche sous-odontoblastique. Le marquage au CD31 permet d'observer la vascularisation de l'implant.

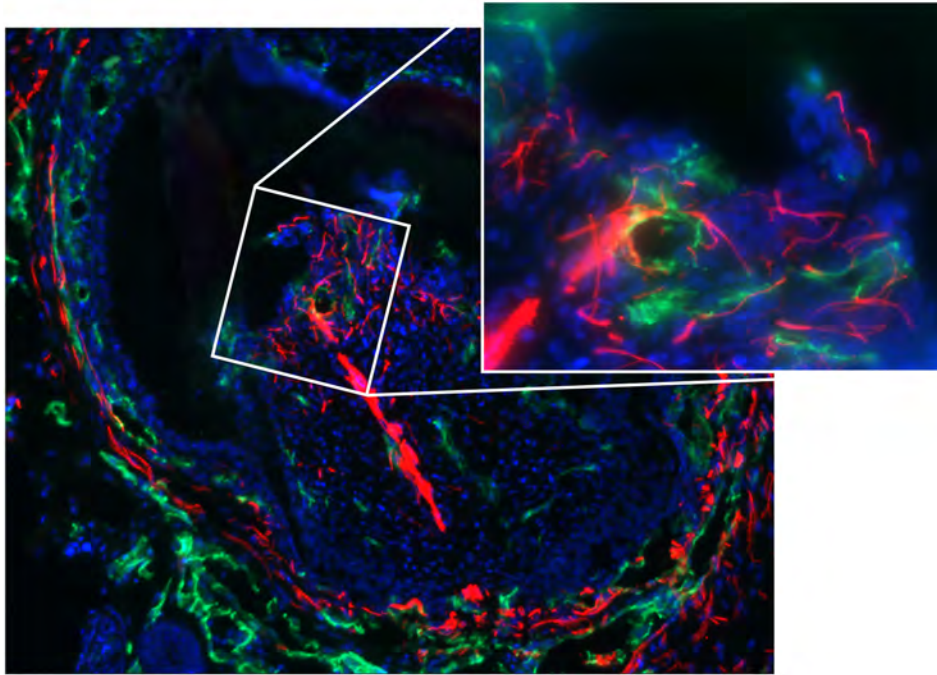


Figure 4 : Immunofluorescence d'un micro-tissu associé à un ganglion trijumeau implanté 14 jours en sous-cutané chez la souris "nude" (Rouge=périphérine, vert=CD31, Bleu=Dapi)

Une nouvelle méthode pour obtenir des organes dentaires par la technique des réassociations épithélio-mésenchymateuses est démontrée ici. Elle est à comparer avec la technique qui consiste à replacer un culot de cellules épithéliales sur un culot de cellules mésenchymateuses. Cette technique a plusieurs avantages :

- Elle est moins opérateur dépendante. En effet, après dissociation, les cellules sont comptées etensemencées grâce à une micropipette. Cela permet de parfaitement contrôler le nombre de cellules pour chaque micro-tissu. Avec la technique des culots, un apprentissage est nécessaire pour parvenir à optimiser au maximum les cellules disponibles. Un opérateur expérimenté réalisera donc un plus grand nombre de réassociations qu'un opérateur débutant.
- Elle permet de parfaitement contrôler le nombre de chaque type cellulaire. Il est ainsi plus aisé de réaliser des réassociations avec des rapports de cellules spécifiques.
- Elle permet d'obtenir un nombre plus important de réassociations avec le même nombre de cellules en début d'expérience que la technique classique.

Ce point est important pour des applications cliniques car les cellules disponibles chez un patient sont en nombre limité.

L'application des micro-tissus au développement dentaire est une technique prometteuse qui permet d'envisager des applications cliniques grâce au faible nombre de cellules nécessaires à la réalisation d'un micro-tissu. Cette technique va aussi permettre de plus facilement pouvoir étudier les interactions entre des cellules d'origine dentaire et des cellules d'autres lignées afin de trouver des "pools" cellulaires alternatifs pour l'ingénierie tissulaire appliquée à l'organe dentaire.

ANNEXE N°3 : Stimulation de l'innervation de la dent grâce à l'immunomodulation

L'étude ci-après met en évidence l'implication de l'immunité dans le contrôle de l'innervation de l'organe dentaire.

VIII. Références

Références

1. Bergenholtz G. Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res*. 1977 Feb;85(2):122–9.
2. Bergenholtz G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(4):467–80.
3. Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge H. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. *J Endod*. 1995 Feb;21(2):62–4.
4. Estrela C, Guedes OA, Silva JA, Leles CR, Estrela CR de A, Pécora JD. Diagnostic and clinical factors associated with pulpal and periapical pain. *Braz Dent J*. 2011;22(4):306–11.
5. Dummer PM, Hicks R, Huws D. Clinical signs and symptoms in pulp disease. *Int Endod J*. 1980 Jan;13(1):27–35.
6. Klausen B, Helbo M, Dabelsteen E. A differential diagnostic approach to the symptomatology of acute dental pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985 Mar;59(3):297–301.
7. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):273–80.
8. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res*. 1985 Apr;64 Spec No:530–40.
9. Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol*. 1998;76(6):923–38.
10. Tananbaum NI. Pulp capping with zinc oxide-eugenol and calcium hydroxide: clinical studies on 135 patients. *J Dent Child*. 1951;18(3):16–20.
11. Mumaw ED, Cooper P. Simplified method of pulp capping adult teeth with calcium hydroxide. *U S Armed Forces Med J*. 1957 Jul;8(7):979–84.
12. Simon ST, Bhat KS, Francis R. Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Oct;80(4):459–64.
13. Khan AA, Sun X, Hargreaves KM. Effect of calcium hydroxide on proinflammatory cytokines and neuropeptides. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1360–3.
14. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011 Aug;44(8):697–730.
15. Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues J-J, Salih E, Tompkins K, et al. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent*. 2003 Feb;16(1):66–76.
16. Willershausen B, Willershausen I, Ross A, Velikonja S, Kasaj A, Blettner M. Retrospective study on direct pulp capping with calcium hydroxide. *Quintessence Int*. 2011 Feb;42(2):165–71.
17. Waterhouse PJ, Nunn JH, Whitworth JM. An investigation of the relative efficacy of Buckley's Formocresol and calcium hydroxide in primary molar vital pulp therapy. *Br Dent J*. 2000 Jan 8;188(1):32–6.

Références

18. Auschill TM, Arweiler NB, Hellwig E, Zamani-Alaei A, Sculean A. [Success rate of direct pulp capping with calcium hydroxide]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2003;113(9):946–52.
19. Cox CF, Sübay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent.* 1996 Feb;21(1):4–11.
20. Bakland LK, Andreasen JO. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review. *Dent Traumatol.* 2012 Feb;28(1):25–32.
21. Schröder U, Granath LE. Early reaction of intact human teeth to calcium hydroxide following experimental pulpotomy and its significance to the development of hard tissue barrier. *Odontol Revy.* 1971;22(4):379–95.
22. Fitzgerald M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J Dent Res.* 1979 Nov;58(Spec Issue D):2198–206.
23. Schröder U, Granath LE. Scanning electron microscopy of hard tissue barrier following experimental pulpotomy of intact human teeth and capping with calcium hydroxide. *Odontol Revy.* 1972;23(2):211–20.
24. Hayashi Y. Ultrastructure of initial calcification in wound healing following pulpotomy. *J Oral Pathol.* 1982 Apr;11(2):174–80.
25. Mjör IA, Dahl E, Cox CF. Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. *J Oral Pathol Med.* 1991 Nov;20(10):496–501.
26. Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *Int Endod J.* 2006 Jun;39(6):429–42.
27. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995 Oct;21(10):489–92.
28. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod.* 1995 Dec;21(12):603–8.
29. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod.* 1995 Aug;21(8):403–6.
30. Simon S, Cooper P, Smith A, Picard B, Ifi CN, Berdal A. Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. *Int Endod J.* 2008 Sep;41(9):781–90.
31. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod.* 2005 May;31(5):387–91.
32. Kuratate M, Yoshida K, Shigetani Y, Yoshida N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2008 Aug;34(8):970–4.
33. Masuda-Murakami Y, Kobayashi M, Wang X, Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, et al. Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. *Acta Histochem.* 2010 Sep;112(5):452–8.

Références

34. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J*. 2002 Mar;35(3):245–54.
35. Tselnik M, Baumgartner JC, Marshall JG. Bacterial leakage with mineral trioxide aggregate or a resin-modified glass ionomer used as a coronal barrier. *J Endod*. 2004 Nov;30(11):782–4.
36. John AD, Webb TD, Imamura G, Goodell GG. Fluid flow evaluation of Fuji Triage and gray and white ProRoot mineral trioxide aggregate intraorifice barriers. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):830–2.
37. Witherspoon DE, Small JC, Harris GZ. Mineral trioxide aggregate pulpotomies: a case series outcomes assessment. *J Am Dent Assoc*. 2006 May;137(5):610–8.
38. El-Meligy OAS, Avery DR. Comparison of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide as pulpotomy agents in young permanent teeth (apexogenesis). *Pediatr Dent*. 2006 Oct;28(5):399–404.
39. Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *J Am Dent Assoc*. 2008 Mar;139(3):305–15; quiz 305–15.
40. Mente J, Hufnagel S, Leo M, Michel A, Gehrig H, Panagidis D, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results. *J Endod*. 2014 Nov;40(11):1746–51.
41. Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res*. 2012 May;91(5):454–9.
42. Corral Nuñez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod*. 2014 Mar;40(3):406–11.
43. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J*. 2013 Sep;46(9):808–14.
44. Shayegan A, Jurysta C, Atash R, Petein M, Abbeele AV. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatr Dent*. 2012 Dec;34(7):e202–8.
45. De Rossi A, Silva LAB, Gatón-Hernández P, Sousa-Neto MD, Nelson-Filho P, Silva RAB, et al. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod*. 2014 Sep;40(9):1362–9.
46. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2013 Jun;39(6):743–7.
47. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand*. 1961 Dec;19:324–53.
48. Myers WC, Fountain SB. Dental pulp regeneration aided by blood and blood substitutes after experimentally induced periapical infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1974 Mar;37(3):441–50.

Références

49. Huang GT-J, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008 Jun;34(6):645–51.
50. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008 Feb;34(2):166–71.
51. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):133–8.
52. Saoud TMA, Zaazou A, Nabil A, Moussa S, Aly HM, Okazaki K, et al. Histological observations of pulpal replacement tissue in immature dog teeth after revascularization of infected pulps. *Dent Traumatol.* 2015 Jun;31(3):243–9.
53. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol.* 2001 Aug;17(4):185–7.
54. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod.* 2004 Apr;30(4):196–200.
55. Thibodeau B. Case report: pulp revascularization of a necrotic, infected, immature, permanent tooth. *Pediatr Dent.* 2009 Apr;31(2):145–8.
56. Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *J Endod.* 2008 Dec;34(12):1474–9.
57. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod.* 2008 May;34(5):611–6.
58. Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol.* 2011 Jan;6(1):13–22.
59. Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Balasubramanian P, Jin G, Valipouri A, Ramakrishna S. Advances in electrospun nanofibers for bone and cartilage regeneration. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013 Jul;13(7):4656–71.
60. Bodic F, Hamel L, Lerouxel E, Baslé MF, Chappard D. Bone loss and teeth. *Joint Bone Spine.* 2005 May;72(3):215–21.
61. Budtz-Jørgensen E. Restoration of the partially edentulous mouth--a comparison of overdentures, removable partial dentures, fixed partial dentures and implant treatment. *J Dent.* 1996 Jul;24(4):237–44.
62. Jemt T, Lekholm U. Implant treatment in edentulous maxillae: a 5-year follow-up report on patients with different degrees of jaw resorption. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995 Jun;10(3):303–11.
63. Friberg B, Jemt T, Lekholm U. Early failures in 4,641 consecutively placed Brånemark dental implants: a study from stage 1 surgery to the connection of completed prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1991;6(2):142–6.
64. Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol.* 1991 Jan;62(1):2–4.

Références

65. Geckili O, Bilhan H, Geckili E, Cilingir A, Mumcu E, Bural C. Evaluation of possible prognostic factors for the success, survival, and failure of dental implants. *Implant Dent*. 2014 Feb;23(1):44–50.
66. Woo I, Le BT. Maxillary sinus floor elevation: review of anatomy and two techniques. *Implant Dent*. 2004 Mar;13(1):28–32.
67. Develioglu H, Altintepe SS. A new bone substitute in the definitive management of furcation involvement: a case report. *West Indian Med J*. 2014 Mar;63(2):197–200.
68. Develioglu H, Saraydin S, Kartal U, Taner L. Evaluation of the long-term results of rat cranial bone repair using a particular xenograft. *J Oral Implantol*. 2010;36(3):167–73.
69. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med*. 2012;10:81.
70. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):106–16.
71. Santana RB, Santana CM. A clinical comparison of guided bone regeneration with platelet-derived growth factor-enhanced bone ceramic versus autogenous bone block grafting. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015 Jun;30(3):700–6.
72. Kovach I, Kosmella S, Prietzel C, Bagdahn C, Koetz J. Nano-porous calcium phosphate balls. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015 May 21;132:246–52.
73. Jang HL, Zheng GB, Park J, Kim HD, Baek H-R, Lee HK, et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of Whitlockite Biocompatibility: Comparative Study with Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate. *Adv Healthc Mater*. 2015 May 12;
74. Bassi APF, Carvalho PSP de. Repair of bone cavities in dog's mandible filled with inorganic bovine bone and bioactive glass associated with platelet rich plasma. *Braz Dent J*. 2011;22(1):14–20.
75. Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology*. 2008 Jul;96(1):1–11.
76. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Jun;21(6):567–76.
77. Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med*. 2008;4:22.
78. Karring T. Regenerative periodontal therapy. *J Int Acad Periodontol*. 2000 Oct;2(4):101–9.
79. Taba M, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res*. 2005 Nov;8(4):292–302.
80. Villar CC, Cochran DL. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am*. 2010 Jan;54(1):73–92.

Références

81. Cortell-Ballester I, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Effects of Collagen Resorbable Membrane Placement After the Surgical Extraction of Impacted Lower Third Molars. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Feb 26;
82. Kim J-Y, Yang B-E, Ahn J-H, Park SO, Shim H-W. Comparable efficacy of silk fibroin with the collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects. *J Adv Prosthodont*. 2014 Dec;6(6):539–46.
83. Döri F, Huszár T, Nikolidakis D, Arweiler NB, Gera I, Sculean A. Effect of platelet-rich plasma on the healing of intra-bony defects treated with a natural bone mineral and a collagen membrane. *J Clin Periodontol*. 2007 Mar;34(3):254–61.
84. Rowe MJ, Kamocki K, Pankajakshan D, Li D, Bruzzaniti A, Thomas V, et al. Dimensionally stable and bioactive membrane for guided bone regeneration: An in vitro study. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2015 May 7;
85. Basile MA, d' Ayala GG, Malinconico M, Laurienzo P, Coudane J, Nottelet B, et al. Functionalized PCL/HA nanocomposites as microporous membranes for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015 Mar;48:457–68.
86. Eap S, Ferrand A, Schiavi J, Keller L, Kokten T, Fioretti F, et al. Collagen implants equipped with “fish scale”-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(8):1253–61.
87. Eap S, Keller L, Schiavi J, Huck O, Jacomine L, Fioretti F, et al. A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1061–75.
88. Steindorff MM, Lehl H, Winkel A, Stiesch M. Innovative approaches to regenerate teeth by tissue engineering. *Arch Oral Biol*. 2014 Feb;59(2):158–66.
89. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(5):425–37.
90. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Dec 5;97(25):13625–30.
91. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):531–5.
92. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 May 13;100(10):5807–12.
93. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado M a. a. M, Shi S, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*. 2010 Aug;89(8):791–6.
94. Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S, et al. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev*. 2010 Sep;19(9):1375–83.
95. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod*. 2009 Nov;35(11):1536–42.

Références

96. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962–9.
97. Papaccio G, Graziano A, d' Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*. 2006 Aug;208(2):319–25.
98. Lindemann D, Werle SB, Steffens D, Garcia-Godoy F, Pranke P, Casagrande L. Effects of cryopreservation on the characteristics of dental pulp stem cells of intact deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. 2014 Sep;59(9):970–6.
99. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10;364(9429):149–55.
100. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE*. 2006;1:e79.
101. Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):406–8.
102. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone*. 2002 Nov;31(5):606–11.
103. Nemoto E, Sakisaka Y, Tsuchiya M, Tamura M, Nakamura T, Kanaya S, et al. Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. *J Periodont Res*. 2015 Jun 12;
104. Ruch JV, Karcher-Djuricic V, Zahnd JP, Stäubli A. [In-vitro culture of mouse embryonic dental rudiments. Ultrastructural study]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1970;164(10):2130–4.
105. Lesot H, Brook AH. Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch Oral Biol*. 2009 Dec;54 Suppl 1:S25–33.
106. Yu J, Jin F, Deng Z, Li Y, Tang L, Shi J, et al. Epithelial-mesenchymal cell ratios can determine the crown morphogenesis of dental pulp stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008 Jun;17(3):475–82.
107. Hu B, Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Peters H, Lesot H. Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue Eng*. 2006 Aug;12(8):2069–75.
108. Kökten T, Bécavin T, Keller L, Weickert J-L, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86011.
109. Keller L, Kuchler-Bopp S, Mendoza SA, Poliard A, Lesot H. Tooth engineering: searching for dental mesenchymal cells sources. *Front Physiol*. 2011;2:7.
110. Keller L-V, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Restoring physiological cell heterogeneity in the mesenchyme during tooth engineering. *Int J Dev Biol*. 2012;56(9):737–46.
111. Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Crown formation during tooth development and tissue engineering. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Jul 15;312B(5):399–407.

Références

112. Nait Lechguer A, Couble ML, Labert N, Kuchler-Bopp S, Keller L, Magloire H, et al. Cell differentiation and matrix organization in engineered teeth. *J Dent Res*. 2011 May;90(5):583–9.
113. Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Hu B, Haïkel Y, Lesot H. Vascularization of engineered teeth. *J Dent Res*. 2008 Dec;87(12):1138–43.
114. Lumsden AG, Davies AM. Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature*. 1983 Jan 22;306(5945):786–8.
115. Løes S, Kettunen P, Kvinnsland H, Luukko K. Mouse rudimentary diastema tooth primordia are devoid of peripheral nerve fibers. *Anat Embryol*. 2002 Jun;205(3):187–91.
116. Luukko K, Kvinnsland IH, Kettunen P. Tissue interactions in the regulation of axon pathfinding during tooth morphogenesis. *Dev Dyn*. 2005 Nov;234(3):482–8.
117. Nosrat CA, Fried K, Ebendal T, Olson L. NGF, BDNF, NT3, NT4 and GDNF in tooth development. *Eur J Oral Sci*. 1998 Jan;106 Suppl 1:94–9.
118. Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil*. 2009 May;36(5):368–89.
119. Ferreira CF, Magini RS, Sharpe PT. Biological tooth replacement and repair. *J Oral Rehabil*. 2007 Dec;34(12):933–9.
120. Yen AH-H, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 2008 Jan;331(1):359–72.
121. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*. 2002 Oct;81(10):695–700.
122. Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng*. 2006 Nov;12(11):3097–105.
123. Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, Tsuchiya S, Sagara H, Kagami H, et al. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3238–48.
124. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008 Apr;34(4):421–6.
125. Zhang W, Frank Walboomers X, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*. 2006 Nov;27(33):5658–68.
126. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Aug 11;106(32):13475–80.
127. Oshima M, Inoue K, Nakajima K, Tachikawa T, Yamazaki H, Isobe T, et al. Functional tooth restoration by next-generation bio-hybrid implant as a bio-hybrid artificial organ replacement therapy. *Sci Rep*. 2014;4:6044.

Références

128. Madhally SV, Matthew HW. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999 Jun;20(12):1133–42.
129. Ravindran S, Song Y, George A. Development of three-dimensional biomimetic scaffold to study epithelial-mesenchymal interactions. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jan;16(1):327–42.
130. Guan Z, Shi S, Samruajbenjakun B, Kamolmatyakul S. Fabrication, characterization and cell cultures on a novel chitosan scaffold. *Biomed Mater Eng*. 2015;25(1 Suppl):121–35.
131. Yang SY, Hwang TH, Che L, Oh JS, Ha Y, Ryu W. Membrane-reinforced three-dimensional electrospun silk fibroin scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Mater*. 2015;10(3):035011.
132. Sahu N, Baligar P, Midha S, Kundu B, Bhattacharjee M, Mukherjee S, et al. Non-mulberry Silk Fibroin Scaffold Shows Superior Osteoconductivity Than Mulberry Silk Fibroin in Calvarial Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2015 Jun 17;
133. Yang J-W, Zhang Y-F, Sun Z-Y, Song G-T, Chen Z. Dental pulp tissue engineering with bFGF-incorporated silk fibroin scaffolds. *J Biomater Appl*. 2015 Mar 18;
134. Yang J-W, Zhang Y-F, Wan C-Y, Sun Z-Y, Nie S, Jian S-J, et al. Autophagy in SDF-1 α -mediated DPSC migration and pulp regeneration. *Biomaterials*. 2015 Mar;44:11–23.
135. Xu W-P, Zhang W, Asrican R, Kim H-J, Kaplan DL, Yelick PC. Accurately shaped tooth bud cell-derived mineralized tissue formation on silk scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2008 Apr;14(4):549–57.
136. Woloszyk A, Holsten Dircksen S, Bostanci N, Müller R, Hofmann S, Mitsiadis TA. Influence of the mechanical environment on the engineering of mineralised tissues using human dental pulp stem cells and silk fibroin scaffolds. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e111010.
137. Dinescu S, Galateanu B, Radu E, Hermenean A, Lungu A, Stancu IC, et al. A 3D Porous Gelatin-Alginate-Based-IPN Acts as an Efficient Promoter of Chondrogenesis from Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2015;2015:252909.
138. Kanafi MM, Ramesh A, Gupta PK, Bhonde RR. Dental pulp stem cells immobilized in alginate microspheres for applications in bone tissue engineering. *Int Endod J*. 2014 Jul;47(7):687–97.
139. Somoza RA, Acevedo CA, Albornoz F, Luz-Crawford P, Carrión F, Young ME, et al. TGF β 3 secretion by three-dimensional cultures of human dental apical papilla mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015 Feb 18;
140. Lambricht L, De Berdt P, Vanacker J, Leprince J, Diogenes A, Goldansaz H, et al. The type and composition of alginate and hyaluronic-based hydrogels influence the viability of stem cells of the apical papilla. *Dent Mater*. 2014 Dec;30(12):e349–61.
141. Bhoj M, Zhang C, Green DW. A First Step in De Novo Synthesis of a Living Pulp Tissue Replacement Using Dental Pulp MSCs and Tissue Growth Factors, Encapsulated within a Bioinspired Alginate Hydrogel. *J Endod*. 2015 Jul;41(7):1100–7.
142. Sasaki T, Kawamata-Kido H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Arch Oral Biol*. 1995 Mar;40(3):209–19.

Références

143. Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, et al. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2010 Jan;92(1):120–8.
144. Galler KM, Cavender A, Yuwono V, Dong H, Shi S, Schmalz G, et al. Self-assembling peptide amphiphile nanofibers as a scaffold for dental stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2008 Dec;14(12):2051–8.
145. Jiang B, Waller TM, Larson JC, Appel AA, Brey EM. Fibrin-loaded porous poly(ethylene glycol) hydrogels as scaffold materials for vascularized tissue formation. *Tissue Eng Part A*. 2013 Jan;19(1-2):224–34.
146. Rizk A, Rabie ABM. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytherapy*. 2013 Jun;15(6):712–25.
147. Xavier Acasigua GA, Bernardi L, Braghirolli DI, Filho MS, Pranke P, Medeiros Fossati AC. Nanofiber scaffolds support bone regeneration associated with pulp stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(4):330–7.
148. Kodonas K, Gogos C, Papadimitriou S, Kouzi-Koliakou K, Tziafas D. Experimental formation of dentin-like structure in the root canal implant model using cryopreserved swine dental pulp progenitor cells. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):913–9.
149. Zheng L, Yang F, Shen H, Hu X, Mochizuki C, Sato M, et al. The effect of composition of calcium phosphate composite scaffolds on the formation of tooth tissue from human dental pulp stem cells. *Biomaterials*. 2011 Oct;32(29):7053–9.
150. Dan H, Vaquette C, Fisher AG, Hamlet SM, Xiao Y, Hutmacher DW, et al. The influence of cellular source on periodontal regeneration using calcium phosphate coated polycaprolactone scaffold supported cell sheets. *Biomaterials*. 2014 Jan;35(1):113–22.
151. Beigi M-H, Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Karbalaie K, Azadeh H, Ramakrishna S, et al. In vivo integration of poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous nerve guide seeded with teeth derived stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Dec;102(12):4554–67.
152. Kim K, Lee CH, Kim BK, Mao JJ. Anatomically shaped tooth and periodontal regeneration by cell homing. *J Dent Res*. 2010 Aug;89(8):842–7.
153. Karadzic I, Vucic V, Jokanovic V, Debeljak-Martacic J, Markovic D, Petrovic S, et al. Effects of novel hydroxyapatite-based 3D biomaterials on proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Jan;103(1):350–7.
154. Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Apr;93(1):247–57.
155. Lobo SE, Glickman R, da Silva WN, Arinzeh TL, Kerkis I. Response of stem cells from different origins to biphasic calcium phosphate bioceramics. *Cell Tissue Res*. 2015 Feb 13;
156. Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*. 1995 Aug;35(2–3):151–60.

157. Wang L, Ryan AJ. 1 - Introduction to electrospinning. In: Bosworth LA, Downes S, editors. *Electrospinning for Tissue Regeneration* [Internet]. Woodhead Publishing; 2011 [cited 2015 Jul 10]. p. 3–33. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978184569741950001X>
158. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science*. 1997 Aug 29;277(5330):1232–7.
159. Leguen E, Chassepot A, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C, Jessel N. Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs. *Biomol Eng*. 2007 Feb;24(1):33–41.
160. Fioretti F, Mendoza-Palomares C, Helms M, Al Alam D, Richert L, Arntz Y, et al. Nanostructured assemblies for dental application. *ACS Nano*. 2010 Jun 22;4(6):3277–87.
161. Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F, Lavallo P, Haïkel Y, Schaaf P, et al. Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jun 6;103(23):8618–21.
162. Ferrand A, Eap S, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, Demoustier-Champagne S, et al. Osteogenic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci*. 2014 Jan;14(1):45–55.
163. Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, Fioretti F, Ladam G, Kuchler-Bopp S, et al. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano*. 2012 Jan 24;6(1):483–90.
164. Facca S, Ferrand A, Mendoza-Palomares C, Perrin-Schmitt F, Netter P, Mainard D, et al. Bone formation induced by growth factors embedded into the nanostructured particles. *J Biomed Nanotechnol*. 2011 Jun;7(3):482–5.
165. Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol*. 2003 Oct;21(10):1171–8.
166. Lynn DM. Layers of opportunity: nanostructured polymer assemblies for the delivery of macromolecular therapeutics. *Soft Matter*. 2006 Mar 16;2(4):269–73.
167. Benkirane-Jessel N, Lavallo P, Meyer F, Audouin F, Frisch B, Schaaf P, et al. Control of Monocyte Morphology on and Response to Model Surfaces for Implants Equipped with Anti-Inflammatory Agent. *Adv Mater*. 2004 Sep 3;16(17):1507–11.
168. Benkirane-Jessel N, Schwinté P, Falvey P, Darcy R, Haïkel Y, Schaaf P, et al. Build-up of Polypeptide Multilayer Coatings with Anti-Inflammatory Properties Based on the Embedding of Piroxicam–Cyclodextrin Complexes. *Adv Funct Mater*. 2004 Feb 1;14(2):174–82.
169. Keller LV, Kökten T, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Chapter 28 - Tooth Organ Engineering. In: Ramalingam AVSS, editor. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* [Internet]. Boston: Academic Press; 2015 [cited 2015 Jul 31]. p. 359–68. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971579000321>
170. Hermansteyne TO, Markowitz K, Fan L, Gold MS. Mechanotransducers in rat pulpal afferents. *J Dent Res*. 2008 Sep;87(9):834–8.

Références

171. Alvarado LT, Perry GM, Hargreaves KM, Henry MA. TRPM8 Axonal expression is decreased in painful human teeth with irreversible pulpitis and cold hyperalgesia. *J Endod.* 2007 Oct;33(10):1167–71.
172. Farges J-C, Keller J-F, Carrouel F, Durand SH, Romeas A, Bleicher F, et al. Odontoblasts in the dental pulp immune response. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009 Jul 15;312B(5):425–36.
173. Griffiths M, Neal JW, Gasque P. Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int Rev Neurobiol.* 2007;82:29–55.
174. Scott D, Scheinin A, Karjalainen S, Edwall L. Influence of sympathetic nerve stimulation on flow velocity in pulpal vessels. *Acta Odontol Scand.* 1972 May;30(2):277–87.
175. Kerezoudis NP, Olgart L, Edwall L, Gazelius B, Nomikos GG. Activation of sympathetic fibres in the pulp by electrical stimulation of rat incisor teeth. *Arch Oral Biol.* 1992 Dec;37(12):1013–9.
176. Sarram S, Lee KF, Byers MR. Dental innervation and CGRP in adult p75-deficient mice. *J Comp Neurol.* 1997 Aug 25;385(2):297–308.
177. Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M, et al. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A.* 2011 May;17(9-10):1389–99.
178. Tannoury CA, An HS. Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J.* 2014 Mar 1;14(3):552–9.
179. Farzaneh M, Abitbol S, Lawrence HP, Friedman S, Toronto Study. Treatment outcome in endodontics-the Toronto Study. Phase II: initial treatment. *J Endod.* 2004 May;30(5):302–9.
180. Ng Y-L, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J.* 2011 Jul;44(7):583–609.
181. Ng Y-L, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of non-surgical root canal treatment: part 2: tooth survival. *Int Endod J.* 2011 Jul;44(7):610–25.
182. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2007 Jun;33(6):680–9.

Listes des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une biopulpotomie avec pose d'un hydroxyde de calcium. CH=hydroxyde de calcium, Li=zone de nécrose superficielle, Co=zone de coagulation (26).....	23
Figure 2 : Photographie d'une exposition pulpaire (a), de la pose d'un MTA (b) et d'un composite (c) chez la souris. (30).....	24
Figure 3 : Radiographie d'une deuxième prémolaire mandibulaire gauche nécrosée avec manifestation péri-apicale (2). Radiographie post-opératoire après mise en place d'une thérapeutique de revascularisation (4). Radiographie de contrôle à 30 mois (5). Un épaissement des parois radiculaire est observable avec une fermeture apicale. La lésion péri-apicale n'est plus visible (53).	27
Figure 4 : Procédure d'élévation du sinus maxillaire (Internet: 1888Implant.com)	31
Figure 5 : Photographie d'un germe dentaire de première molaire mandibulaire de souris au stade JE14 (jour embryonnaire).....	39
Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de mise en oeuvre des réassociations épithélio-mésenchymateuses appliquées à l'organe dentaire (108).	40
Figure 7 : Image de MEB d'une membrane Bio-Gide™ avant (A) et après fonctionnalisation (B) par des nanoréservoirs de facteurs de croissance (86)...	42
Figure 8 : Images de MEB d'une membrane épaisse électrospinnée en PCL non fonctionnalisée (A, C, E) et fonctionnalisée (B, D, F) par des nanoréservoirs constitués de chitosan et de BMP-7 (87).....	43
Figure 9 : Images de MEB de gels d'alginate avec différentes porosités (137).....	45
Figure 10 : Image de MEB du gel d'alginate avec une forme adaptée à une insertion dans un canal radiculaire (141).	46
Figure 11 : Image de microscopie confocale de l'implant en alginate recouvert de DPSCs et d'HUVECs (141).....	47
Figure 12 : Schéma du montage de l'électrospinning.....	53
Figure 13 : Schéma représentant la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes (158).	54
Figure 14 : Image de MEB à différents grossissements des nanofibres d'une membrane électrospinnée de PCL (A et B) avant fonctionnalisation, après fonctionnalisation avec la technique des LBL avec (PLL/BMP-2) ³ qui donne des nanoréservoirs de forme sphérique (C et D) et après fonctionnalisation avec la	

technique des LBL avec (CHI/BMP-2) ₃ qui donne des nanoréservoirs en forme d'écaille (E et F). Barres : A, C et E = 1 μ m; C, D et F = 100 nm	55
Figure 15 : Appareillage standard présent au laboratoire : Electrospinning Apparatus EC-DIG (IME Technologies). (Photo : Sandy Eap).....	61
Figure 16 : Image macroscopique de membranes fines de PCL électrospinnées dans une plaque de 24 puits avec un montage sur insert (A). Image d'un insert (B). (Photos : Sandy Eap).....	62
Figure 17 : Métalliseur Cressington 108auto/SE associé à une pompe Duo Line (Photo : Sandy Eap)	64
Figure 18 : Embryon de souris au 14 ^e jour embryonnaire (A), de la mandibule après dissection avec mise en évidence des deux germes de première molaire mandibulaire (B) et de germe de molaire après dissection. (Photo : Tunay Kökten)	65
Figure 19 : Tête de souris PN 2-3 (A), de la localisation des ganglions trijumeaux après dissection et d'un ganglion trigéminal prélevé (Photo : Tunay Kökten)	67
Figure 20 : Implantation en sous-cutané chez une souris ICR (Photo : Sandy Eap) .	73

Listes des tableaux

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés <i>in vitro</i>	69
Tableau 2 : Anticorps secondaires utilisés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	69
Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés <i>in vivo</i>	74

