



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**ACADEMIE DE NANCY-METZ**  
**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ NANCY I**  
**FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE**

Année 2015

N° 7016

**THESE**  
pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN CHIRURGIE DENTAIRE**

par

**Julia FLEURENTIN**

Née le 11 octobre 1989 à Metz (Moselle)

**INGENIERIE TISSULAIRE ET CELLULES SOUCHES  
PULPAIRES**

présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2015

Examineurs de la thèse :

Monsieur P. AMBROSINI	Professeur des universités	Président
<u>Monsieur M. ENGELS-DEUTSCH</u>	Maître de Conférences des universités	<u>Directeur</u>
Madame V. STUTZMANN-MOBY	Maître de Conférences des universités	Juge
<u>Monsieur M. VINCENT</u>	Assistant hospitalier universitaire	<u>Codirecteur</u>
Madame P. NICOLAS-FLEURENTIN	Docteur en chirurgie dentaire	Invitée

Vice-Doyens : Pr Pascal AMBROSINI — Dr Céline CLEMENT

Membres Honoraires : Dr L. BABEL – Pr. S. DURIVAUX – Pr A. FONTAINE – Pr G. JACQUART – Pr D. ROZENCWEIG – Pr M. VIVIER – Pr ARTIS –

Doyen Honoraire : Pr J. VADOT, Pr J.P. LOUIS

Professeur Emérite : Pr J.P. LOUIS

Maître de conférences CUM MERITO : Dr C. ARCHIEN

<b>Sous-section 56-01</b> Odontologie pédiatrique	Mme M. Mlle Mlle Mlle	<u><b>DROZ Dominique (Desprez)</b></u> PREVOST Jacques HERNANDEZ Magali JAGER Stéphanie LAUVRAY Alice	Maître de Conférences* Maître de Conférences Assistante* Assistante* Assistante
<b>Sous-section 56-02</b> Orthopédie Dento-Faciale	Mme M. Mlle Mlle	<u><b>FILLEUL Marie Pierryle</b></u> EGLOFF Benoît BLAISE Claire LACHAUX Marion	Professeur des Universités* Maître de Conf. Associé Assistante Assistante
<b>Sous-section 56-03</b> Prévention, Epidémiologie, Economie de la Santé, Odontologie légale	Mme M. Mme	<u><b>CLEMENT Céline</b></u> CAMELOT Frédéric LACZNY Emily	Maître de Conférences* Assistant* Assistante
<b>Sous-section 57-01</b> Parodontologie	M. Mme M. M. Mlle Mlle	<u><b>AMBROSINI Pascal</b></u> BISSON Catherine PENAUD Jacques JOSEPH David BOLONI Eszter PAOLI Nathalie	Professeur des Universités* Maître de Conférences* Maître de Conférences Maître de Conf. Associé Assistante Assistante*
<b>Sous-section 57-02</b> Chirurgie Buccale, Pathologie et Thérapeutique  Anesthésiologie et Réanimation	Mme M. Mlle M. M. Mlle M. Mlle M.	<u><b>GUILLET-THIBAUT Julie</b></u> BRAVETTI Pierre PHULPIN Bérengère VIENNET Daniel BALZARINI Charlotte DELAITRE Bruno KICHENBRAND Charlene MASCHINO François	Maître de Conférences* Maître de Conférences Maître de Conférences* Maître de Conférences Assistante Assistant Assistante* Assistant
<b>Sous-section 57-03</b> Sciences Biologiques (Biochimie, Immunologie, Histologie, Embryologie, génétique, Anatomie pathologique, , Bactériologie, Pharmacologie)	M. M. M.	<u><b>YASUKAWA Kazutoyo</b></u> MARTRETTE Jean-Marc WESTPHAL Alain	Maître de Conférences* Professeur des Universités* Maître de Conférences*
<b>Sous-section 58-01</b> Odontologie Conservatrice, Endodontie	M. M. M. M. M. Mlle M.	<u><b>ENGELS-DEUTSCH Marc</b></u> AMORY Christophe BALHAZARD Rémy MORTIER Éric BON Gautier MUNARO Perrine VINCENT Marin	Maître de Conférences Maître de Conférences Maître de Conférences* Maître de Conférences Assistant Assistante Assistante*
<b>Sous-section 58-02</b> Prothèse complète, Prothèse maxillo-faciale)	M. x M. Mlle M. M. Mlle Mme	<u><b>DE MARCH Pascal</b></u> xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx SCHOUVER Jacques CORNE Pascale LACZNY Sébastien MAGNIN Gilles SIMON Doriane VAILLANT Anne-Sophie	Maître de Conférences Maître de Conférences* Maître de Conférences Assistante* Assistant Assistant Assistante Assistante*
<b>Sous-section 58-03</b> Sciences Anatomiques et Physiologiques Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique, Radiologie	Mlle M. Mme M. M.	<u><b>STRAZIELLE Catherine</b></u> RAPIN Christophe (Sect. 33) MOBY Vanessa (Stutzmann) SALOMON Jean-Pierre HARLE Guillaume	Professeur des Universités* Professeur des Universités* Maître de Conférences* Maître de Conférences Assistant Associé

*Par délibération en date du 11 décembre 1972,  
la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que  
les opinions émises dans les dissertations  
qui lui seront présentées  
doivent être considérées comme propres à  
leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner  
aucune approbation ni improbation.*

**A notre Maître et Président du jury,**

**Monsieur le Professeur Pascal AMBROSINI**

Docteur en Chirurgie Dentaire

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

Vice-Doyen au budget et aux affaires hospitalières

Habilité à diriger des Recherches

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Responsable de la Sous-section : Parodontologie

*Vous nous avez fait l'honneur  
d'accepter la présidence de ce jury de  
thèse et nous vous en remercions.*

*Ce travail est également l'occasion de  
vous remercier pour la qualité de vos  
enseignements ainsi que de la  
sympathie dont vous avez fait preuve  
au cours de nos études d'odontologie.*

*Nous vous prions de trouver dans ce  
travail toute l'expression de notre  
gratitude.*

**A notre Maître et Directeur,**

**Monsieur le Docteur Marc ENGELS-DEUTSCH**

Docteur en Chirurgie Dentaire

Docteur de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Responsable de la Sous-section : Odontologie Conservatrice – Endodontie

*Nous vous sommes très reconnaissants  
d'avoir eu la gentillesse d'accepter  
aussi spontanément de diriger ce  
travail.*

*Nous vous remercions pour vos  
enseignements en matière  
d'endodontie.*

*Veuillez trouver ici notre profond  
respect.*

**A notre Maître et Juge,**

**Madame le Docteur Vanessa STUTZMANN-MOBY**

Docteur en Chirurgie Dentaire

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section : Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique, Radiologie.

*Vous nous faites l'honneur de vous intéresser à notre travail et d'accepter de faire partie de notre jury de thèse.*

*Nous vous remercions pour votre enthousiasme concernant ce sujet.*

*Nous sommes reconnaissants du savoir que vous nous avez transmis.*

*Vous trouverez ici le témoignage de notre profond respect.*

**A notre Maître et Codirecteur,**

**Monsieur le Docteur Marin VINCENT**

Docteur en chirurgie dentaire

Assistant Hospitalier Universitaire

Sous-section : Odontologie Conservatrice – Endodontie

*Nous vous sommes très reconnaissants  
d'avoir accepté de codiriger ce travail.*

*Nous vous remercions tout  
particulièrement pour votre présence  
et votre écoute tout au long de la  
rédaction de ce mémoire ainsi que  
pour le temps que vous nous avez  
consacré.*

*Merci pour votre sympathie et votre  
disponibilité.*

*Veuillez trouver ici l'expression de  
notre profonde gratitude.*

**A notre Maître et Invitée,**

**Madame le Docteur Pascale NICOLAS-FLEURENTIN**

Docteur en chirurgie dentaire

*Nous vous remercions d'avoir accepté  
de faire partie du jury de ce travail,  
cela compte beaucoup pour nous.*

# Remerciements

A mes parents,

C'est grâce à vous si j'en suis arrivée là. Merci pour le bonheur que vous m'avez apporté et pour tous les sacrifices que vous avez fait pour moi. J'ai eu la chance d'avoir une enfance heureuse et je vous en suis reconnaissante. Je ne suis pas très démonstrative mais sachez que je vous aime de tout mon cœur.

A mes grands-parents Huguette et Albert,

Vous êtes partis trop tôt. J'espère que vous êtes fiers de moi.

A ma grand-mère Mamie Blouch,

Merci pour ta gentillesse, ta générosité et ton affection. Promis je vais essayer de ne plus jouer tout le temps les mêmes morceaux au piano.

A ma marraine et tante Pascale et mon oncle Richard,

Merci pour votre soutien et tous ces moments passés en votre compagnie en Normandie, devant Mr Manhattan etc...

A mon oncle Jacques,

Merci pour ta sympathie et tes explications en prothèse amovible quand je ne comprenais rien. Cela m'a valu des bonnes notes.

A toute ma famille, mes cousins Fred<sup>2</sup>, Guillaume, Charlotte, oncles et tantes.

A Delphine,

Tous ces moments passés avec toi n'ont été que du bonheur. La P1 a presque été « agréable » en ta compagnie avec cacahuète, la BM, le roux, l'homme au gilet vert, Nathalie et j'en passe...Je te souhaite plein de réussite et de bonheur pour la suite, tu le mérites.

A Marine,

Par où commencer ? Par le CD de Claude François dans la microcar, la branche dans l'œil, nos vacances en Corse avec Del ou nos partitions de piano ? Repenser à tous ces souvenirs me fait sourire. Tu es toujours là quand il faut et tu sais trouver les bons mots. Merci de tes attentions et de tes conseils, je sais que je peux compter sur toi.

A Johanna,

Grâce à toi ces années d'études ont été plus que géniales. La P2 où l'on ne faisait RIEN, la nuit en mode sarcophage, le « jsuis bouré, jpeux dormir chez toi ? », nos siestes resteront gravés dans ma mémoire. Je te souhaite plein de bonheur avec Simon, pourvu qu'il arrête de se moquer de mes créneaux.

A Johanne,

Mon orthodontiste préférée. Merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme. Le lycée fut le début de notre amitié qui sera encore longue et riche je l'espère.

A Constance, Flora, Alice, Bertrand,

Parce que ces études n'auraient pas eu la même saveur sans vous. Bertrand, je garde un excellent souvenir de la T1 grâce à toi.

A Anne-Lise,

Merci pour ta gentillesse, tous nos coups de fils, nos soirées sushi qui me manquent. Je te souhaite plein de bonheur pour la suite.

A Eloïse,

Merci pour tes conseils précieux en OC et tous les fous rires qui ont suivi grâce à nos patients exhibitionnistes... J'espère que les kilomètres qui nous séparent à présent n'auront pas raison de notre amitié.

A Jessica,

Merci pour ta bonne humeur en paro et surtout de m'avoir motivée pour gym direct !

A France, Stéphane et bébé Jean,

Je suis ravie d'avoir fait votre connaissance. Je vous souhaite plein de bonheur à tous les trois.

A Edouard,

Tu m'as supporté pendant la rédaction de ce travail (et surtout la mise en page), je t'en suis reconnaissante. Merci d'être à mes côtés chaque jour et de me soutenir. Je te remercie en dernier pour la simple et bonne raison qu'on garde le meilleur pour la fin.

# **INGENIERIE TISSULAIRE ET CELLULES SOUCHES PULPAIRES**

## **TABLES DES MATIERES**

INTRODUCTION	15
1. L'odontogenèse	17
1.1. Rappels	17
1.2. Les différentes étapes du développement dentaire	17
1.2.1. Stade de placode dentaire	17
1.2.2. Stade de lame dentaire	18
1.2.3. Stade de bourgeon dentaire	18
1.2.4. Stade de cupule dentaire	19
1.2.5. Stade de cloche dentaire	19
2. Les tissus dentaires	20
2.1. L'émail	21
2.1.1. Organisation	21
2.1.2. Composition	23
2.2. La dentine	24
2.2.1. Définition	24
2.2.2. Composition	24
2.2.3. Structure	25
2.2.4. Dentinogenèse	26
2.3. La pulpe	31
2.3.1. Rôles de la pulpe	31
2.3.2. Structure anatomique	31
2.3.3. Aspect histologique	32
2.3.3.1. La zone odontoblastique	33
2.3.3.2. Une zone acellulaire	35
2.3.3.3. Une zone riche en cellules : la couche de Høehl	35
2.3.3.4. La zone centrale	36
2.3.3.4.1. Les cellules de la zone centrale	36
2.3.3.4.2. La matrice extra-cellulaire	38
2.3.3.5. La vascularisation pulpaire	39
2.3.3.6. L'innervation pulpaire	40
3. Les cellules souches	41
3.1. Le concept des cellules souches	41
3.1.1. Définition	41
3.1.2. Caractéristiques	42
3.1.3. Potentiel de différenciation	43
3.2. Les cellules souches pluripotentes embryonnaires (CSE)	44
3.2.1 Les iPSC (Induced Pluripotent Stem Cells) : cellules souches pluripotentes induites	45
3.2.2 Exemple : CSE et dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)	47
3.3. Les cellules souches multipotentes adultes	48
3.3.1. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)	48
3.3.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)	49
3.4. Les cellules souches dentaires	50
3.4.1. Les cellules souches pulpaires (DPSC)	50
3.4.1.1. Découverte	50
3.4.1.2. Caractéristiques phénotypiques des DPSC	52

3.4.1.3. Différenciation des DPSC	54
3.4.1.3.1. Différenciation en cellules neuronales	54
3.4.1.3.2. Différenciation en lignée mésodermique	55
3.4.1.3.3. Différenciation en lignée endodermique	57
3.4.1.3.4. Cardiologie et circulation sanguine	57
3.4.1.3.5. Différenciation en cornée	57
3.4.1.3.6. Différenciation en odontoblastes	58
3.4.1.4. Les niches de cellules souches	58
3.4.2. Les cellules souches identifiées dans la dent humaine à partir de dents temporaires exfoliées (SHED)	60
3.4.2.1. Découverte	60
3.4.2.2. Méthode de culture et d'isolation	60
3.4.2.3. Caractéristiques	61
3.4.2.4. Potentiel de différenciation : similaire aux cellules souches mésenchymateuses	61
3.4.2.4.1. Ostéoblastes	62
3.4.2.4.2. Adipocytes	63
3.4.2.4.3. Cellules neurales	63
3.4.2.4.4. Chondrocytes	64
3.4.2.4.5. Myocytes	64
3.4.2.4.6. Cellules endothéliales	64
3.4.2.4.7. Hépatocytes	64
3.4.2.4.8. Cellules pancréatiques	65
3.4.2.4.9. Odontoblastes	66
3.4.3. Autres types cellules souches	66
3.4.3.1. Les cellules souches du desmodonte ou ligament parodontal (PDLSC)	66
3.4.3.2. Les cellules souches de la papille apicale (SCAP)	67
3.4.3.3. Les cellules souches issues du follicule dentaire (DFPC)	71
4. Ingénierie tissulaire et applications des cellules souches pulpaire <i>in vivo</i>	72
4.1. Introduction	72
4.2. Les banques de cellules souches (DPSC et SHED)	73
4.3. Applications des cellules souches pulpaire <i>in vivo</i>	76
4.3.1. Introduction	76
4.3.2. Régénération <i>in vivo</i> d'un tissu qui s'apparente au complexe dentino-pulpaire : étude de Rebecca <i>et al.</i> (2008)	77
4.3.2.1. Matériel et méthode	77
4.3.2.2. Résultats	78
4.3.2.3. Discussion	80
4.3.3. Régénération dentinaire après exposition pulpaire sur un modèle de rat	81
4.3.3.1. Matériel et méthode	81
4.3.3.1.1. Fabriquer la pulpe artificielle	81
4.3.3.1.2. Implantation des pulpes artificielles	82
4.3.3.2. Résultats	84
4.3.3.2.1. Suivi des cellules marquées radioactivement	84
4.3.3.2.2. Analyse histologique	85
4.3.3.3. Limites de l'expérience	87
4.3.4. Reprogrammer des DPSCs en cellules souches pluripotentes induites (iPSC)	87

CONCLUSION	90
BIBLIOGRAPHIE	91
TABLE DES ILLUSTRATIONS	106
LISTE DES ABBREVIATIONS	110

# INTRODUCTION

La cavité buccale est colonisée par de nombreux micro-organismes dont les streptocoques oraux sont les composants majeurs. L'éruption des dents est un élément fondamental avec la multiplication des surfaces et donc de nouveaux sites d'adhésion pour les bactéries. Les streptocoques du groupe *mutans* sont considérés comme les agents étiologiques principaux du processus carieux. Ils entraînent la déminéralisation puis la destruction des tissus minéralisés dentaires, ce qui déclenche une réaction inflammatoire pulpaire et une libération de médiateurs de l'inflammation. Lorsque la charge bactérienne est importante, l'inflammation entraîne la nécrose pulpaire. S'ajoutent à cela les traumatismes bucco-dentaires, entraînant des altérations irréversibles de substances minérale et pulpaire, d'où les éventuelles nécroses qui en découlent et qui, sans traitement, peuvent aboutir à la perte de la dent.

Les alternatives actuellement utilisées sont des moyens artificiels faisant appel à des restaurations coronaires directes (résine composite, amalgame, ciment verre-ionomère) ou indirectes (résine, céramique, or) qui remplacent le tissu lésé mais ne restaurent pas son intégrité ni sa fonction propre.

L'ingénierie tissulaire est un ensemble de techniques qui se basent sur les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts biologiques permettant de restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus. L'émergence de cette nouvelle stratégie date de la fin des années 1980 grâce aux récentes connaissances sur la culture cellulaire et les facteurs de croissance.

En 2000, des travaux menés par l'équipe de Gronthos ont permis de mettre en évidence la présence de cellules souches dans la pulpe dentaire et de les isoler (Gronthos *et al.*, 2000). A l'avenir, le but est de mettre au point de nouvelles stratégies de conservation des tissus dentaires basées sur une approche naturelle d'auto-réparation de la dent :

- lorsque le tissu pulpaire est lésé, il s'agit de cultiver ces cellules souches pour recréer une « pulpe artificielle » afin de l'implanter dans un modèle de pulpotomie dans une dent de rat immunodéprimé et d'en étudier la formation d'un tissu pulpaire fonctionnel : est-il vascularisé, innervé ? Ya-t-il présence de cellules de type odontoblastes nouvellement différenciées le long de la paroi dentinaire ? Ces dernières produisent-elles de la dentine de réparation ?

- la thérapie régénérative peut être utilisée pour réparer une perforation d'un canal radiculaire. Le but est de recréer du tissu minéralisé grâce à trois composants essentiels : les cellules souches, un support et des facteurs de croissance.

L'objectif de ce travail est de décrire les bases fondamentales probablement amenées à révolutionner notre comportement clinique dans un futur proche, tout en gardant à l'esprit que ces recherches ne sont pas encore adaptées à la clinique humaine à cause des risques de rejets et de la législation.

## 1. L'odontogenèse

### 1.1. Rappels

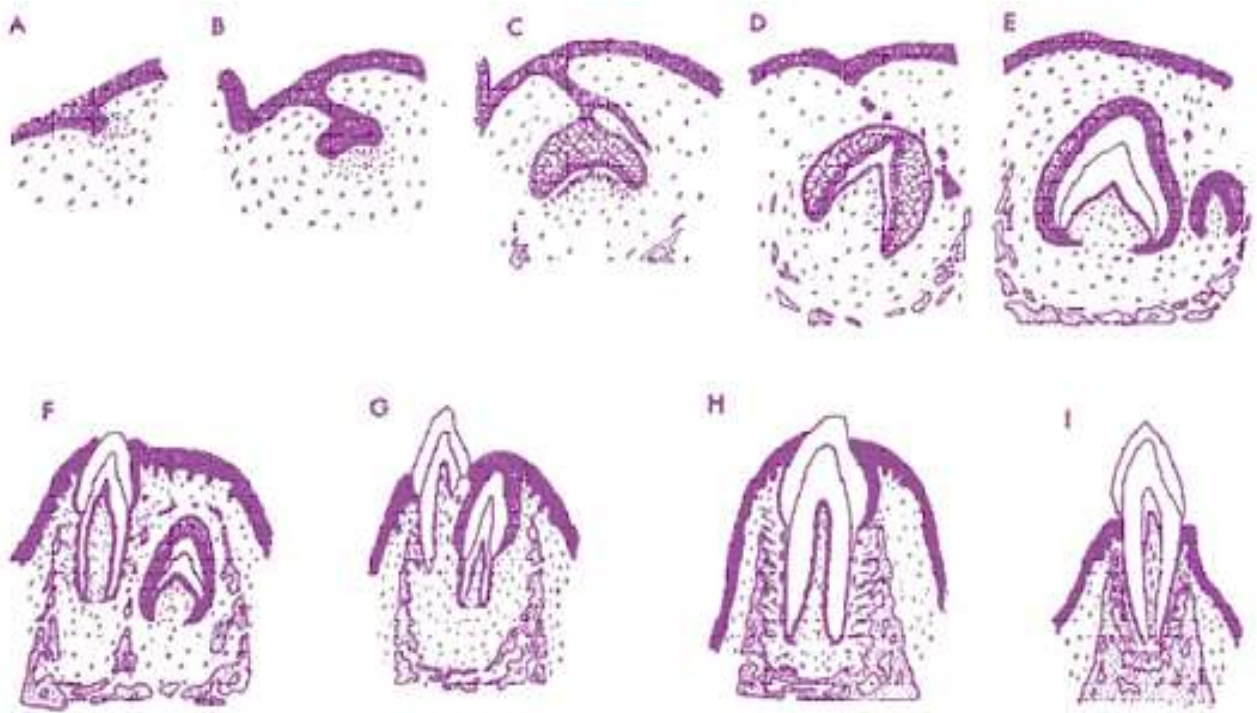
L'odontogenèse est associée avec les étapes initiales de développement crânio-facial et est régulée par des interactions épithélio-mésenchymateuses. L'émail et la dentine n'ont pas la même origine. L'émail est synthétisé par les améloblastes qui proviennent de l'épithélium oral, qui provient lui-même de l'ectoderme (Robinson *et al.*, 1995). La dentine est synthétisée par les odontoblastes qui proviennent de l'ecto-mésenchyme (Ruch *et al.*, 1995 ; Smith et Lesot, 2001).

Le mésenchyme, dans le premier arc branchial, est appelé ecto-mésenchyme car des cellules des crêtes neurales (CCN) y ont migré. L'ecto-mésenchyme va interagir avec l'épithélium oral pour former les territoires des incisives, canines et molaires dans chaque quadrant des deux maxillaires. L'expression de FGF-8 (*Fibroblast Growth Factor*) et BMP-4 (*Bone Morphogenetic Protein*) dans l'épithélium oral permet d'activer les gènes homéobox (Hox) qui contrôlent la morphogenèse. Ces gènes créent un « homéocode » spécifique pour les cellules progénitrices de chaque type de dent. Ils jouent donc un rôle crucial dans la régulation spatio-temporelle de l'odontogenèse.

### 1.2. Les différentes étapes du développement dentaire

#### 1.2.1. Stade de placode dentaire

Les interactions épithélio-mésenchymateuses représentent un véritable dialogue moléculaire. A la 5<sup>ème</sup> semaine de vis embryonnaire, un signal épithélial va entraîner une activité dans l'ectomésenchyme. La sécrétion de BMP4 par l'épithélium induit l'expression du gène *Msx1* par l'ectomésenchyme. Le facteur BMP2 issu du tissu mésenchymateux active aussi *Msx1* qui permet le bourgeonnement épithélial responsable de la formation de la placode dentaire (**Figure 1** : stade A). A ce moment, la membrane basale sépare l'épithélium de l'ecto-mésenchyme sous-jacent. Les interactions épithélio-mésenchymateuses sont cruciales tant pour la formation des placodes dentaires que pendant les différentes étapes de l'odontogenèse.



**Figure 1.** Schéma récapitulatif de l'odontogenèse ([www.arquivos.unama.br](http://www.arquivos.unama.br)) ; A : placode épithéliale, B : bourgeon dentaire, C : cupule dentaire, D : cloche dentaire, E : édification de la couronne de la dent lactéale (DL) et début d'édification de la dent permanente (DP), F : édification de la racine DL et édification de la couronne DP, G : rhizolyse de la racine DL, H : la DP fait son éruption lorsque deux tiers de la racine sont formés, I : DP sur arcade, l'apex se ferme.

### 1.2.2. Stade de lame dentaire

Les cellules épithéliales proches de la membrane basale se multiplient (4 à 5 couches de cellules) et s'invaginent dans l'ecto-mésenchyme sous-jacent, donnant naissance à la lame dentaire (Ruch, 1985 ; Peterkova *et al.*, 1996). L'ecto-mésenchyme change alors de composition et devient plus dense. Cette invagination épithéliale marque l'apparition de la zone de la future couronne dentaire et se développera à travers plusieurs stades (bourgeon, cupule, cloche).

### 1.2.3. Stade de bourgeon dentaire

Chaque lame dentaire est à l'origine d'un bourgeon dentaire (stade B). L'invagination progresse, les cellules de l'ecto-mésenchyme entourent le bourgeon épithélial.

#### 1.2.4. Stade de cupule dentaire

Ensuite, les changements de forme du bourgeon dentaire aboutissent à la formation de la cupule dentaire (stade C). Ce stade est caractérisé par la concavité de l'épithélium qui enveloppe partiellement le mésenchyme sous-jacent.

L'ectomésenchyme se condense dans la cavité de l'organe de l'email. Il forme alors la papille dentaire qui est à l'origine des odontoblastes et de la pulpe dentaire. Pendant la transition entre les stades de cupule et de cloche dentaire, de nombreux changements sont observés. Tous les éléments de l'organe de l'email se distinguent sur le plan histologique :

- l'épithélium améloblastique externe (EAE) localisé à la périphérie de la cupule, en contact avec le mésenchyme,
- l'épithélium améloblastique interne (EAI) formé par les cellules qui sont les précurseurs des améloblastes et qui sont séparées de la future pulpe dentaire par la membrane basale,
- le réticulum étoilé et le *stratum intermedium*, deux couches intermédiaires de l'organe de l'email, impliquées dans les transferts de protéines de l'email,
- le nœud de l'email primaire puis secondaire situé au centre de l'organe de l'email, qui contrôle la morphogénèse des futures dents avec l'aide de signaux provenant du mésenchyme (Jernvall *et al.*, 1998). A ce stade, l'identité tissulaire est contenue dans le mésenchyme. L'induction mésenchymateuse va transformer le tissu épithélial.

#### 1.2.5. Stade de cloche dentaire

Le stade de cupule dentaire est suivi par le stade de cloche dentaire (stade D), pendant lequel la couronne dentaire va acquérir sa différenciation morphologique finale. Les patrons cuspidiens spécifiques à chaque dent se mettent en place.

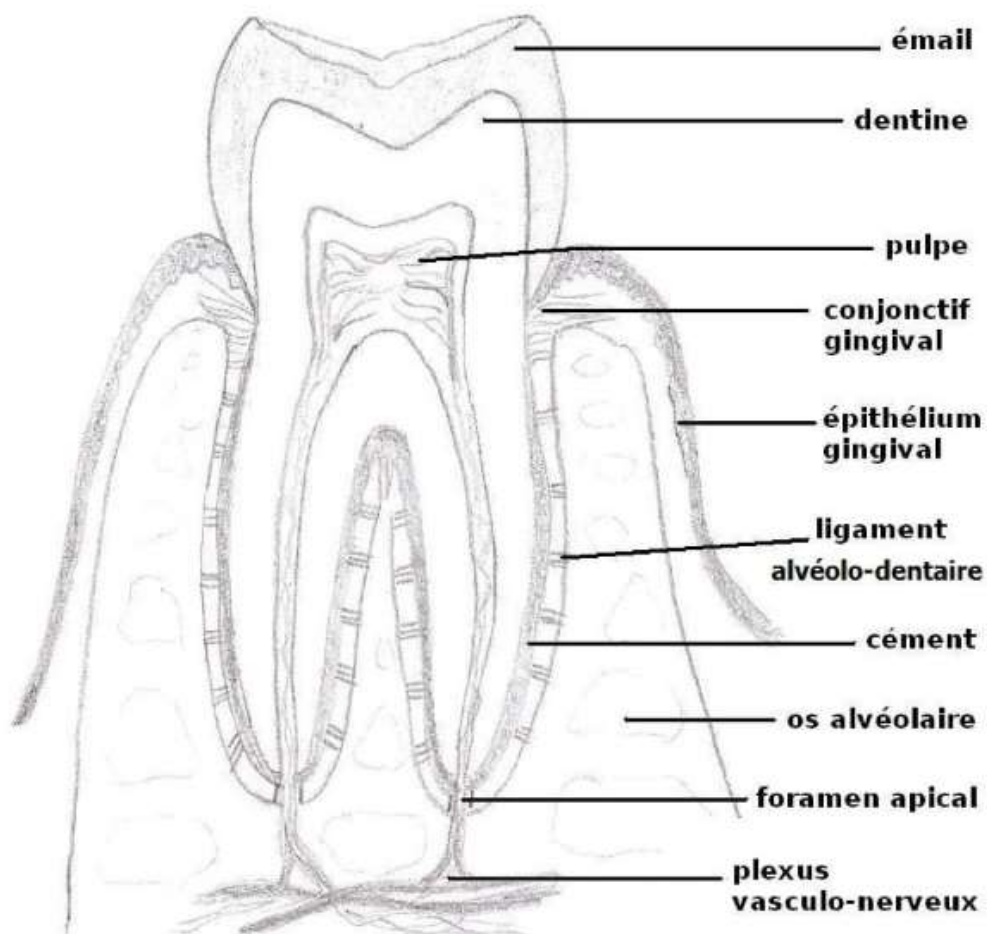
A la fin du stade de cloche, les EAI et EAE se rencontrent pour former une double couche épithéliale ; la zone de réflexion de l'email. Les deux feuillets accolés forment une lame qui s'enfonce dans le tissu conjonctif : c'est la gaine épithéliale de Hertwig. Cette dernière induit la différenciation des pré-odontoblastes en odontoblastes produisant la dentine radiculaire. Lorsque les premières couches de dentine radiculaire sont formées, la gaine se désagrège en laissant « les débris épithéliaux de Malassez ».

L'ecto-mésenchyme condensé situé à la périphérie de l'organe de l'émail et de la papille dentaire forme le sac folliculaire. Il donnera naissance au cément, au ligament alvéolo-dentaire et à l'os alvéolaire.

## 2. Les tissus dentaires

Structure de la dent :

L'organe dentaire est constitué par la dent, appelée aussi odonte, et ses tissus de soutien appelés parodonte (Piette et Goldberg, 2001). L'odonte comprend une partie coronaire : la couronne dentaire, et une partie radiculaire : la ou les racines. Différents tissus minéralisés le constituent : l'émail, la dentine et la pulpe. Le parodonte comprend quant à lui le cément, le ligament alvéolo-dentaire (périodonte ou desmodonte), l'os alvéolaire et la gencive (**Figure 2**).



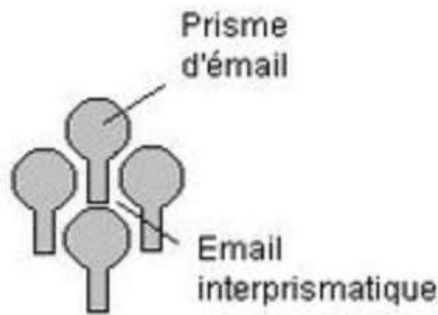
**Figure 2.** La dent et son parodonte (Piette et Goldberg, 2001).

## 2.1. L'email

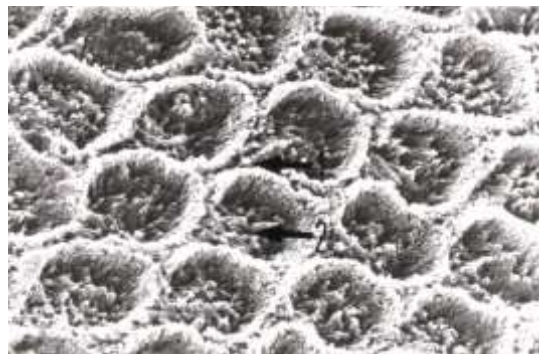
L'email est sécrété par les améloblastes qui perdent leur activité sécrétoire à la fin de l'amélogénèse et disparaissent après éruption de la dent sur l'arcade (Bartlett *et al.*, 2006). L'email recouvre la couronne dentaire jusqu'à la jonction amélo-cémentaire, c'est-à-dire jusqu'au niveau de la zone cervicale de la dent. La jonction amélo-cémentaire détermine la limite entre la couronne, recouverte d'email, et la racine, recouverte de ciment. C'est le tissu le plus dur, le plus minéralisé et le plus radio-opaque de l'organisme. L'email n'est ni innervé ni vascularisé ; la carie amélaire est toujours indolore. L'email est un capital à conserver car c'est le seul tissu à ne pas se renouveler ni se desquamer. Son épaisseur est variable : 2,5 mm au sommet des cuspidés et il s'amincit progressivement vers la jonction amélo-cémentaire.

### 2.1.1. Organisation

- La couche la plus interne de l'email correspond à la jonction amélo-dentinaire (JAD). Son épaisseur est d'environ 30  $\mu\text{m}$ . Elle ne contient pas de prisme, elle est appelée couche aprismatique interne. La JAD est une interface peu minéralisée qui lie étroitement email aprismatique interne et manteau dentinaire. Ce n'est pas une ligne continue. Il s'agit d'interpénétrations email-dentine. C'est une zone plus riche en matière organique que les autres. La cohésion du complexe est assurée par des fibres de collagène. Ces faisceaux de fibres forment des poutres massives pouvant amortir les contraintes, dévier et empêcher la propagation des fissures de l'email. Elle joue donc un rôle de défense dans la protection de la dentine.
- La couche intermédiaire, appelée couche prismatique, forme la plus grande partie de l'épaisseur de l'email. Un prisme est une sous-unité structurale de l'email. Il existe plusieurs millions de prismes par dent. Chaque prisme traverse l'email dans toute son épaisseur, depuis la jonction amélo-dentinaire jusqu'à la surface externe de la dent qui est aprismatique. Le trajet des prismes est sinueux puis se termine perpendiculairement à la surface de l'email. Un prisme mesure 3 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre et est formé par des milliers de cristallites. Chaque prisme est limité par une gaine constituée par un réseau continu d'email interprismatique (Piette et Goldberg, 2001) (**Figures 3 et 4**).



**Figure 3.** Représentation schématique de l'imbrication des prismes de l'émail (VonTasha, 2006).



**Figure 4.** Prismes de l'émail observés en microscopie électronique à balayage à fort grossissement ; coloration par projection d'une pellicule d'or ; 1 : cristaux interprismatiques ; 2 : cristaux prismatiques dont l'orientation est différente (Leloup, 2007).

En coupe longitudinale, des stries parallèles au contour externe de l'émail et à la jonction amélo-dentinaire sont visibles (**Figure 5**).



**Figure 5.** Microphotographies en microscopie optique d'émail humain sur des coupes de dents calcifiées préparées par usure montrant l'orientation des stries de Retzius (R) ; à gauche : préparation effectuée dans l'axe longitudinal de la dent ; à droite : en section transversale (Piette et Goldberg, 2001).

Il s'agit des stries de Retzius, encore appelées lignes de croissance. Elles correspondent à des phases de moindre minéralisation lors de la formation de l'émail. Elles témoignent de la rythmicité de l'amélogénèse.

- La périphérie de l'émail ne contient pas de prisme. On trouve des cristaux parallèles entre eux et perpendiculaires à la surface de l'émail. Tout comme la couche interne, la couche externe est en continuité avec l'émail interprismatique. Les stries de Retzius peuvent être visibles à la surface des couronnes où elles forment des périkymaties, structures microscopiques linéaires et parallèles entre elles. Au cours du vieillissement, on observe des changements de l'émail : une usure de surface éliminant une partie ou la totalité de la couche aprismatique externe (Piette et Goldberg, 2001).

### 2.1.2. Composition

L'émail est une combinaison phospho-calcique du type « apatite » accrochée sur une trame organique. L'émail des dents permanentes est composé de :

- 96% de matière minérale inorganique. Les apatites sont des sels doubles faits de phosphate de calcium et d'un autre sel de calcium ayant pour formule générale :  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6\text{CaX}_2$ . X peut être OH (cela donne des cristaux d'hydroxyapatites), F (cela donne des fluoroapatites), ou  $\text{CO}_3$  (cela donne carbonatoapatites).
- 4% de matière organique : dont 1% représenté par des lipides, des glycoprotéines riches en tyrosine (amélogénines, énamélines, *tuft protein*) et des polysaccharides. Les 3% restant sont représentés par l'eau.
- Différents ions et traces d'éléments (carbone, fluor) peuvent être incorporés ou absorbés dans les cristaux d'hydroxyapatites s'ils sont présents durant l'élaboration de l'émail, un processus appelé amélogénèse (Fincham *et al.*, 1999).

Des échanges ioniques de surface se produisent au niveau de l'interface émail/milieu buccal à partir de l'éruption de la dent et se poursuivent tout au long de la vie. Le pH du milieu buccal et les concentrations en calcium et en phosphate de l'émail modulent ces échanges (Renson, 1995).

## **2.2. La dentine**

### **2.2.1. Définition**

La dentine est un tissu conjonctif dur et minéralisé qui forme la charpente de la dent. C'est le tissu dentaire qui a le volume le plus important. Elle est sécrétée par les odontoblastes. Un odontoblaste est une cellule mésenchymateuse située dans la pulpe dentaire.

La dentine est revêtue par l'émail au niveau coronaire et par le cément au niveau radiculaire (Lasfargues et Colon, 2010). Elle forme de par sa relation intime avec la pulpe le complexe dentino-pulpaire.

La dentine n'est pas vascularisée, mais contrairement à l'émail elle est innervée. C'est pour cette raison que la carie dentinaire est souvent révélée par la douleur.

### **2.2.2. Composition**

La dentine est moins dure que l'émail, elle est composée à 70% par des cristaux d'hydroxyapatites, à 20% par des trames organiques et à 10% par de l'eau (Goldberg, 2011).

La composition de la partie minérale varie selon l'âge, car la minéralisation se poursuit tout au long de la vie du parenchyme pulpaire. On y retrouve des sels minéraux avec principalement des carbonates de calcium, des phosphates de calcium, des sulfates, du fluor, du chlore, du sodium.

La matrice organique est composée à 90% de collagènes (essentiellement de type I) et de 10% de matière non collagénique. Les protéines matricielles non collagéniques sont divisées en deux groupes :

- les protéines non collagéniques spécifiques de la dentine :
  - la phosphoprotéine dentinaire (DPP),
  - la sialoprotéine dentinaire (DSP),
- les protéines non collagéniques non spécifiques de la dentine :
  - la protéine de la matrice dentinaire (DMP-1),
  - l'ostéopontine (OPN),
  - la sialoprotéine osseuse (BSP),
  - l'ostéocalcine,

- l'ostéonectine,
- des protéoglycanes.

La matrice dentinaire contient aussi des protéines sériques comme l'albumine, des facteurs de croissance, des enzymes de clivage et de régulation, des amélogénines et des phospholipides (Farges, 2011). Les facteurs de croissance tels que TGF- $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor*), BMP, sont impliqués dans la régénération et la réparation du complexe dentino-pulpaire (Piette et Goldberg, 2001).

### 2.2.3. Structure

Elle comprend :

- les prolongements des odontoblastes,
- les canalicules dentinaires,
- la dentine péricanaliculaire,
- la dentine intercanaliculaire.

Elle est de couleur jaunâtre et translucide. En microscopie, la dentine apparaît parcourue par des *tubuli* ou canalicules dentinaires placés perpendiculairement à la surface de l'émail et à la surface de la racine, lui conférant sa perméabilité (**Figure 6**).



**Figure 6.** Coupe de dentine observée au microscope électronique à balayage à fort grossissement ; en 1 : canalicule dentinaire ; en 2 : tissu dentinaire ; coloration par projection d'une pellicule d'or (Leloup, 2007).

Ces canalicules dentinaires contiennent l'expansion cytoplasmique des odontoblastes. Le nombre de canalicules varie selon la zone dentinaire : on en trouve plus de 50 000/mm<sup>2</sup> à proximité de la pulpe (Lasfargues et Colon, 2010). Plus on s'éloigne du centre de la pulpe, moins on trouve de canalicules : 20 000/mm<sup>2</sup> en périphérie. De même, les canalicules voient leur diamètre diminuer

lorsqu'ils sont proches de la périphérie de la dentine. Le diamètre moyen d'un canalicule à proximité de la pulpe est de 2,5 à 3µm, tandis qu'en périphérie dentinaire il est de 0,5µm (Lasfargues et Colon, 2010). Donc plus on se rapproche de la pulpe, plus la perméabilité augmente.

La couche superficielle externe, appelée manteau dentinaire, est acanaliculaire et couvre une épaisse couche de dentine canaliculaire. Cette dernière est constituée de trois éléments : les canalicules dentinaires, la dentine péricanaliculaire et la dentine intercanaliculaire (**Figure 7**).

- La dentine péricanaliculaire est très minéralisée. Elle recouvre la paroi des canalicules dentinaires (Beer *et al.*, 2008). Elle est sécrétée tout au long de la vie de la dent, et peut parfois être accélérée, par exemple en cas d'agression carieuse, ce qui conduit à une sclérose dentinaire (Simon *et al.*, 2008).
- La dentine intercanaliculaire sépare les canalicules les uns des autres. Elle est caractérisée par une minéralisation plus faible (Beer *et al.*, 2008).



**Figure 7.** Dentine péricanaliculaire, intercanaliculaire, et canalicules dentinaires observés au microscope électronique à balayage (x3000) (Pinto *et al.*, 2012).

#### 2.2.4. Dentinogénèse

Il s'agit de l'étape de sécrétion réalisée par les odontoblastes. Elle comprend deux phases essentielles.

En premier lieu, il y a sécrétion par les odontoblastes d'une couche de 15 à 20µm d'épaisseur appelée **pré-dentine**, composée de matière organique (fibres de collagènes de type I et protéoglycanes).

Ensuite, cette pré-dentine se transforme progressivement en **dentine minéralisée** au niveau d'un front de minéralisation. Cette minéralisation est due à la précipitation de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) sur les fibres de collagène (Johansen, 1964).

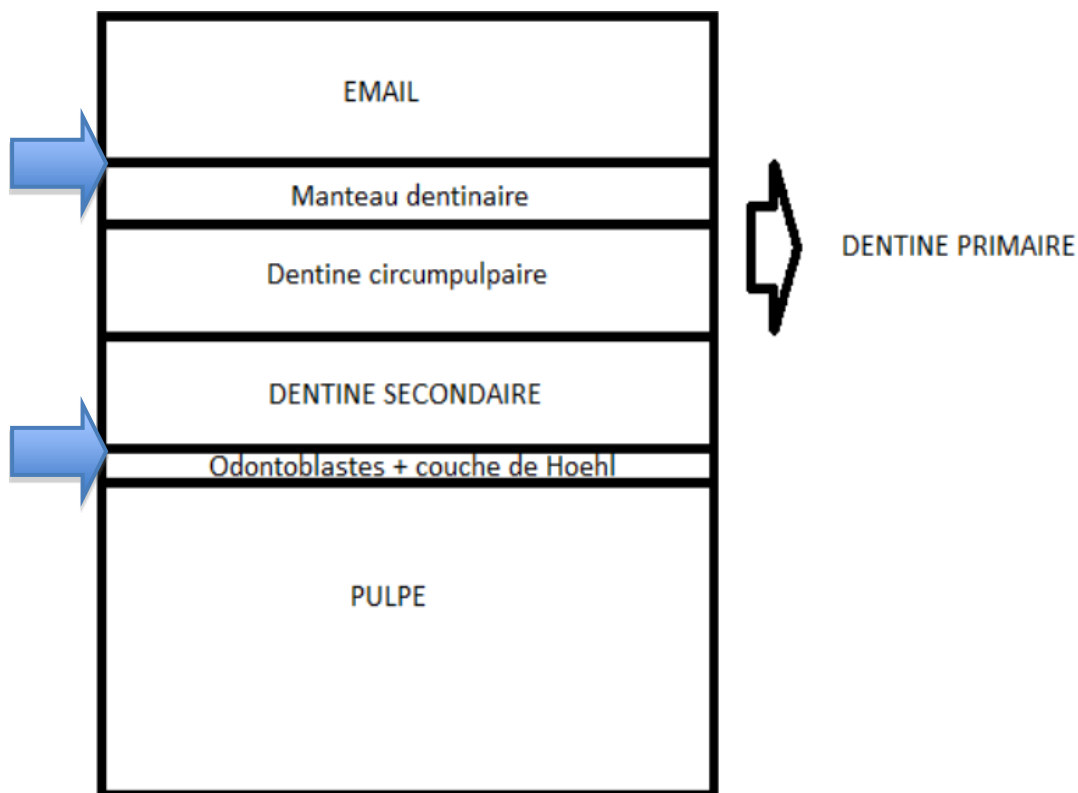
Histologiquement, il existe trois types de dentine :

- **La dentine primaire** : elle est formée lors du développement dentaire et jusqu'à la mise en fonction de la dent sur l'arcade (Lasfargues et Colon, 2010). Elle correspond au manteau dentinaire et à la dentine circumpulpaire.

Le manteau dentinaire est la couche la plus externe de la dentine, situé juste sous l'émail. Il est atubulaire, peu minéralisé et pauvre en phosphoprotéines. Son épaisseur est de 20 à 150µm (Goldberg, 2008). Son apposition sur les fibres de collagène se fait perpendiculairement à la jonction amélo-dentinaire.

La formation de cette couche va permettre aux odontoblastes d'achever leur différenciation et d'acquérir leur fonction spécialisée de sécrétion. Ils vont ensuite sécréter la dentine circumpulpaire en reculant vers le centre de la pulpe. Leurs prolongements cytoplasmiques traversent donc la pré-dentine.

La dentine primaire circumpulpaire est une orthodentine tubulaire régulière. Elle comprend la dentine intra- et péri-canaliculaire (**Figure 8**).



**Figure 8.** Les différentes couches de dentine dans une dent. JAD : jonction amélo-dentinaire ; JDP : jonction dentino-pulpaire.

○ **La dentine secondaire** : elle est formée au stade fonctionnel de la dent sur l'arcade, ou après fermeture apicale, et pendant toute la vie de la dent (Simon *et al.*, 2008). C'est une orthodentine circumpulpaire régulière déposée en continuité avec la dentine primaire. Elle est la cause de la réduction progressive de la lumière canalaire. Elle est parcourue par des canalicules dentinaires moins réguliers que la dentine primaire. Elle s'appose principalement sur le plafond et le plancher de la chambre pulpaire. Sa vitesse d'apposition est plus lente (Simon *et al.*, 2008) (**Figure 8**).

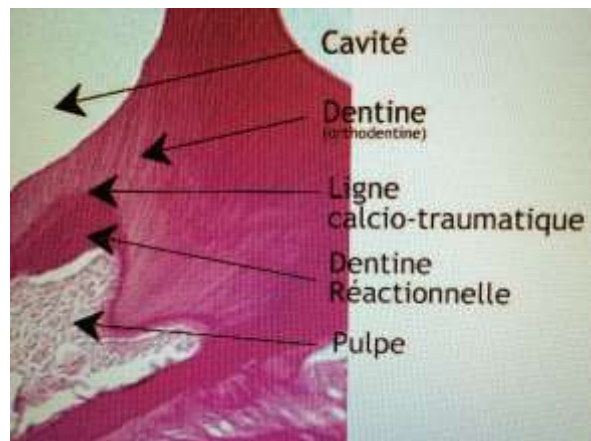
○ **La dentine tertiaire** : elle est synthétisée en réponse à une agression (caries, traumatismes thermiques ou mécaniques, lésions d'usure...) afin de protéger la pulpe (Simon *et al.*, 2008). Cette dentine est irrégulière et souvent acanaliculaire. Selon l'intensité de l'agression, il y aura différentes réactions de défense en regard de la zone touchée : formation de dentine réactionnelle ou réparatrice.

- ◆ La dentine réactionnelle : elle est synthétisée en cas d'agression modérée (par exemple : une carie superficielle ou à progression lente). L'agression étant modérée, il n'y a pas destruction des odontoblastes, ce sont donc les odontoblastes de première génération post-mitotiques qui vont la synthétiser, avec la participation des cellules de la couche de Höehl (Murray *et al.*, 2003). Ces dernières sont des cellules filles situées plus à distance de la membrane basale. Elles constituent la couche sous-odontoblastique. Elles peuvent devenir des odontoblastes fonctionnels. Ce sont des cellules de remplacement terminales, situées dans la pulpe et prêtes à se différencier en cas de destruction des odontoblastes sus-jacents, ou si ces derniers ne parviennent pas à vaincre une agression modérée (Nancy, 2003). La dentine réactionnelle s'appose lentement, en continuité avec la dentine secondaire (Lasfargues et Colon, 2010). C'est une dentine canaliculaire.

Lors de la déminéralisation de la dentine due au processus carieux, des facteurs de croissance tels que TGF- $\beta$ 1 et BMP-7 sont solubilisés (Farges, 2011). En cheminant dans les canalicules dentinaires, ils atteignent les odontoblastes et les stimulent. La fibronectine est importante car elle permet de moduler le TGF- $\beta$ 1 (Piette et Goldberg, 2001). Ces facteurs sont utilisés dans la recherche sur le processus de

cicatrisation dentino-pulpaire. Ils représentent une voie de signalisation potentielle (Simon *et al.*, 2008). En jouant sur leur expression, les odontoblastes seraient activés et secrèteraient une matrice dentinaire minéralisée afin de protéger la pulpe vivante.

Le début d'apposition de dentine réactionnelle est marqué par la formation d'une ligne calcio-traumatique qui se distingue de la dentine secondaire avec laquelle elle est en continuité (**Figure 9**).



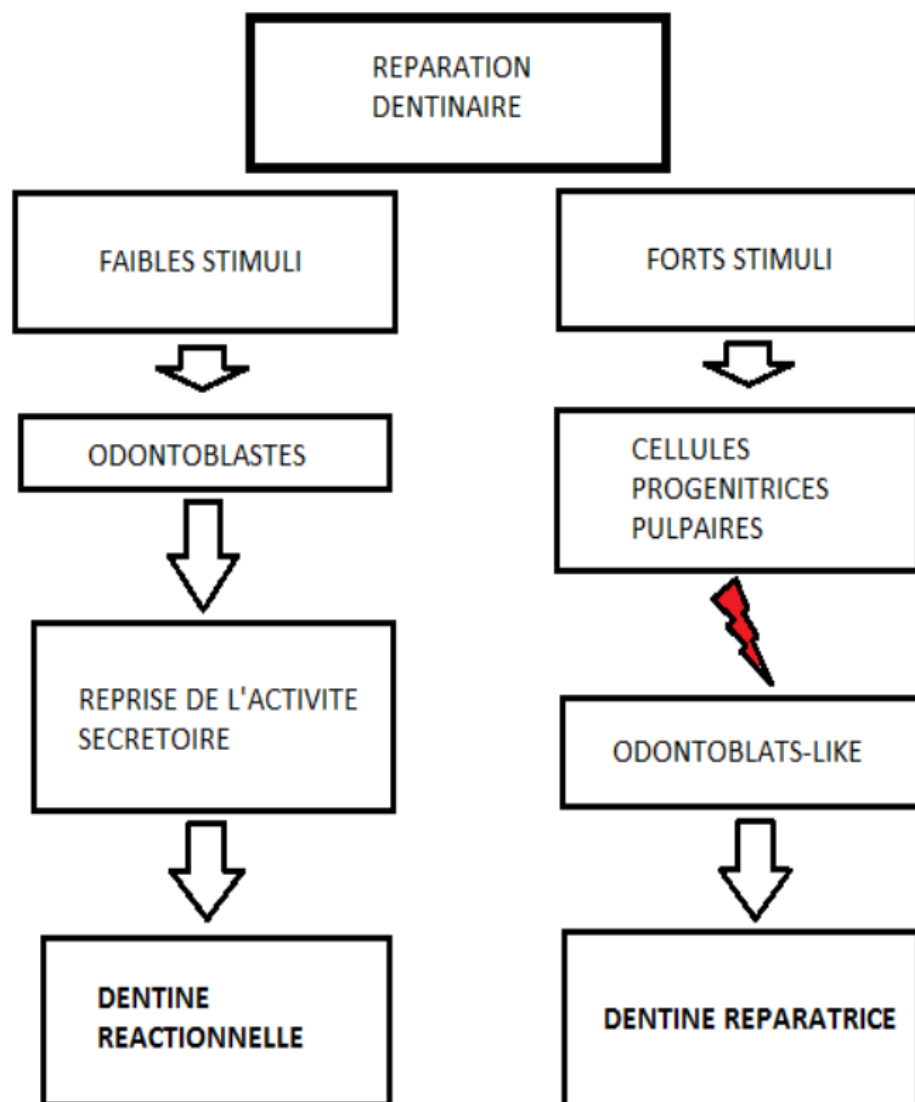
**Figure 9.** Coupe histologique frontale d'une molaire de souris ayant été traitée avec une obturation coronaire. (x40 – Coloration Van Gieson) (Simon *et al.*, 2008).

- ♦ La dentine réparatrice : elle est synthétisée en cas d'agression sévère (carie profonde ou à progression rapide, effraction pulpaire...) qui entraîne la destruction des odontoblastes. Ces derniers ne peuvent se diviser car ce sont des cellules différenciées post-mitotiques. Afin de sécréter à nouveau une matrice minéralisée, de nouvelles cellules progénitrices indifférenciées sont recrutées au sein de la pulpe. Ces progéniteurs vont mettre 20 jours à se différencier en cellules dites *odontoblasts-like* (ou odontoblastes secondaires), puis une dizaine de jours à débiter la sécrétion de dentine réparatrice au niveau de la zone lésée. Il y a donc une interruption de la sécrétion de dentine, qui se traduit par la formation d'une ligne calcio-traumatique.

Les odontoblastes secondaires n'ont pas un phénotype polarisé comme les odontoblastes primaires. La matrice élaborée est acanaliculaire, riche en fibres de collagène de type I (88%) et III (12%), ainsi qu'en fibronectine. Etant moins minéralisée que la dentine physiologique, elle a une structure semblable à la

matrice osseuse. Elle est appelée ostéodentine ou fibrodentine (les corps cellulaires sont à l'intérieur du tissu minéralisé) (Lasfargues et Colon, 2010).

Lors d'un coiffage pulpaire, cette dentine réparatrice forme le pont dentinaire (Murray *et al.*, 2002). La pulpe est isolée du milieu extérieur. A ce moment, les cellules accrochées à la fibrodentine se polarisent, et sécrètent de façon semblable aux odontoblastes une dentine tubulaire de type orthodentine. Il s'agit de la fin du processus de cicatrisation pulpaire.



**Figure 10.** Les deux types de réparation dentinaire.

### 2.3. La pulpe

La pulpe est un tissu conjonctif hétérogène lâche composé de différents types de cellules et d'une matrice extra-cellulaire riche en collagène. Elle contient aussi des vaisseaux et des nerfs. C'est le seul tissu non minéralisé de la dent.

#### 2.3.1. Rôles de la pulpe

La pulpe joue de nombreux rôles :

- Nutrition des odontoblastes et élimination des déchets pour fabriquer une dentine de qualité. La vascularisation pulpaire permet l'apport des éléments nutritifs aux odontoblastes, ce qui leur permet de jouer leur rôle dans l'édification de la trame organique et la minéralisation de la dentine (élaboration de la dentine primaire à l'origine, secondaire tout au long de la vie, tertiaire en cas d'agression).
- Protection : l'innervation dentinaire permet d'une part de transmettre des messages d'alarme (douleur) face à de nombreux éléments agressifs (mécanique, chimique et biologique), et d'autre part de réguler le flux sanguin qui permet une activité adaptée des odontoblastes.
- Défense et réparation : La pulpe dentaire est un organe parfaitement apte à se défendre. Elle répond aux agressions par une accélération de la dentinogénèse et des dépôts de dentine scléreuse afin d'isoler la pulpe des agresseurs. La dentine possède un équipement complet et efficace en cellules immuno-compétentes et en médiateurs chimiques de l'immunité. Ces réactions de défense immunitaire peuvent être très précoces, par exemple au stade de début de carie de l'émail (*white-spot*). Néanmoins la réaction inflammatoire qui correspond en partie à ces phénomènes de défense peut devenir pathologique et provoquer des œdèmes importants et des destructions cellulaires qui conduiront à la mort du complexe dentino-pulpaire.

#### 2.3.2. Structure anatomique

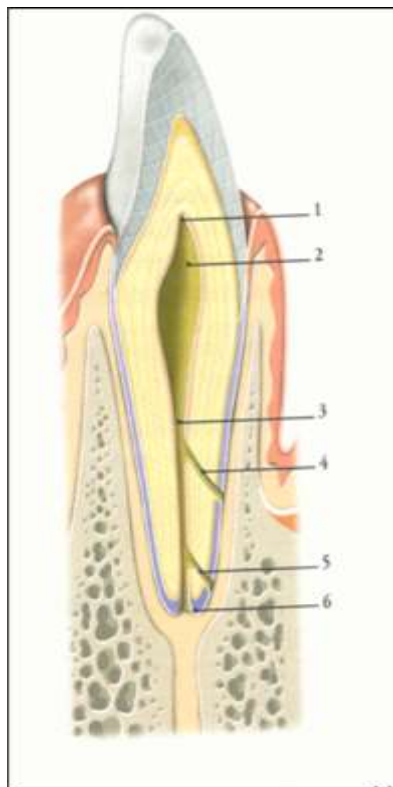
La pulpe est située au centre de la dent dans un espace clos et inextensible appelé cavité pulpaire (**Figure 11**). Elle-même est faite de deux parties :

- une portion large située à l'intérieur de la couronne, c'est la chambre pulpaire, contenant la pulpe coronaire,

- une portion plus étroite située à l'intérieur des racines, c'est le canal radiculaire, contenant la pulpe radiculaire.

La chambre présente des cornes pulpaire plus ou moins larges situées sous les cuspidés. Au niveau de l'apex, la pulpe se termine par un orifice, le foramen apical, par lequel arrivent les éléments vasculo-nerveux. A côté du canal principal, le tiers apical de la racine contient souvent des canaux accessoires, secondaires ou latéraux qui contiennent des diverticules pulpaire.

La forme générale de la pulpe est en relation avec celle du contour externe de la dent. Elle peut subir des modifications morphologiques comme la réduction de son volume suite à la dentinogenèse ou la sclérose liée au vieillissement.



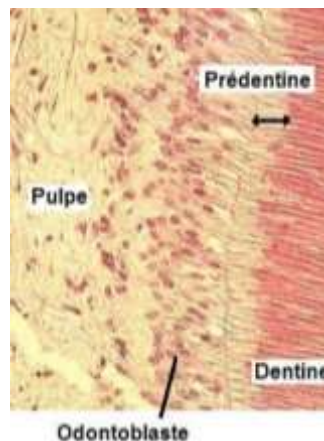
**Figure 11.** Cavité pulpaire. 1 : corne pulpaire. 2 : chambre pulpaire. 3 : canal radiculaire. 4 : canal latéral. 5 : canal secondaire. 6 : foramen apical (Brix et Lebeau, 2011).

### 2.3.3. Aspect histologique

Histologiquement, la pulpe est faite de quatre zones allant de la périphérie vers le centre (Mjor *et al.*, 2001).

### 2.3.3.1. La zone odontoblastique

Cette zone est située en périphérie de la pulpe, sous la dentine. Elle est composée d'odontoblastes organisés en palissade : c'est une véritable barrière protectrice de la pulpe (**Figure 12**).



**Figure 12.** Mise en évidence des odontoblastes alignés le long de l'interface dentino-pulpaire, les prolongements orientés vers la dentine (Licht, 1999).

Les odontoblastes sont des cellules hautement différenciées et polarisées. Ils sont issus de la différenciation des cellules ectomésenchymateuses. La différenciation commence à la périphérie de la papille dentaire, sous les futures cuspides et s'étend en direction apicale. Situées sous la membrane basale de l'épithélium dentaire interne (EDI), les cellules ectomésenchymateuses reçoivent des signaux pour qu'elles arrêtent de proliférer. Ces signaux sont des activateurs de la différenciation en odontoblastes. Les cellules augmentent de taille, deviennent alors des pré-odontoblastes puis des odontoblastes polarisés et sécréteurs quand ils entrent en contact avec la membrane basale. Le corps cellulaire s'allonge, un prolongement cytoplasmique apparaît avec des ramifications. Ce dernier entre dans le compartiment pré-dentinaire où il sécrète de la pré-dentine. Il mesure alors 20 à 30µm de long, et le corps cellulaire 50µm (Piette et Goldberg, 2001). Les corps cellulaires constituent la couche odontoblastique et reculent de façon centripète vers le centre de la pulpe camérale au fur et à mesure de la sécrétion dentinaire. Puis les prolongements odontoblastiques pénètrent dans les canalicules dentinaires en sécrétant la matrice dentinaire.

Le pôle apical est donc doté d'un prolongement odontoblastique qui chemine dans les canalicules dentinaires. Pendant le développement dentaire, le prolongement permet la sécrétion

des composants de la matrice dentinaire (Goldberg et Smith, 2004). Il s'étend dans le tiers voire la moitié interne de la dentine. Le pôle basal contient le noyau.

L'aspect des odontoblastes varie en fonction de leur état fonctionnel :

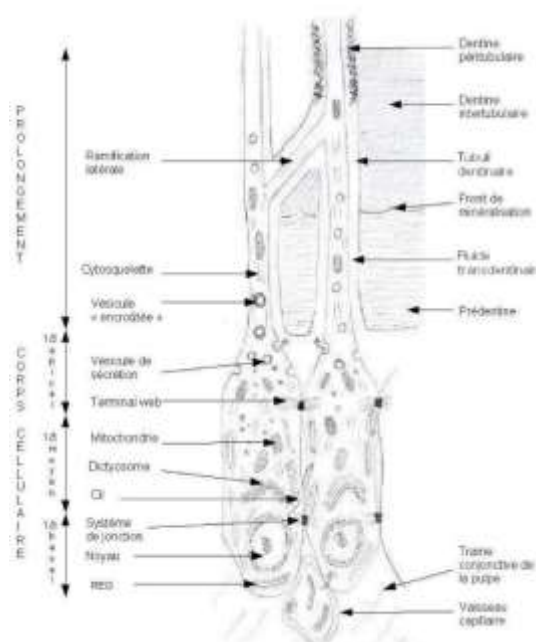
- En phase de synthèse : les cellules sont cylindriques, elles ont un noyau basal à chromatine dispersée en amas périphériques, et possèdent plusieurs nucléoles. Le nucléole est le lieu de fabrication de l'ARN constitutif des ribosomes.

L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique granulaire (REG) sont très développés. La cellule possède une forte activité enzymatique de par ses phosphatases alcalines.

De nombreuses vésicules de sécrétions sont produites par le Golgi et sont transportées vers la base du prolongement cytoplasmique. Entre les cellules se situent un grand nombre de jonctions de type desmosomes (Piette et Goldberg, 2001).

Le prolongement cytoplasmique qui traverse successivement la prédentine et la dentine minéralisée est presque dépourvu d'organites et renferme des microtubules et des filaments.

- En phase de repos : les cellules sont aplaties avec un noyau à chromatine dense. Leur cytoplasme est pauvre en organites et dépourvu de vésicules de sécrétion.
- Il existe une phase de transition : la cellule est étroite et possède un noyau central à chromatine condensée (**Figure 13**).



**Figure 13.** Schéma représentant deux odontoblastes sécréteurs (Linde et Goldberg, 1993).

### **2.3.3.2. Une zone acellulaire**

C'est la couche sous-odontoblastique. Appelée aussi zone acellulaire de Weil, son épaisseur est de 40µm. Elle est surtout présente au niveau des cornes pulpaire. Elle contient les branches terminales des fibres nerveuses sensibles et autonomes ainsi que les anses vasculaires terminales (Piette et Goldberg, 2001). Ce réseau de fibres constitue le plexus de Rashkow (Bletsa *et al.*, 2009).

### **2.3.3.3. Une zone riche en cellules : couche de Høehl**

Les cellules de la couche de Høehl prennent leur origine à partir des dernières divisions des pré-odontoblastes. Les odontoblastes sont organisés au début en une couche faite de quatre rangées de cellules. Pendant la maturation et le vieillissement de la dent, le nombre d'odontoblastes diminue à cause de phénomènes d'apoptoses, pour finir par une fine couche unique de cellules. La probabilité pour que les odontoblastes aient une durée de vie courte est grande. Ainsi, ce sont les cellules sous-odontoblastiques qui sont impliquées dans leur remplacement. Une fois leur différenciation terminale achevée, elles deviennent des odontoblastes de seconde génération. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les cellules de la couche de Høehl expriment fortement l'activité phosphatase alcaline (ALP). La majorité des cellules sous-odontoblastiques exprime Thy-1 qui est un marqueur de surface des cellules souches et des cellules progénitrices. La capacité d'expression de Thy-1 par les cellules sous-odontoblastiques a été évaluée en suivant des stimulations par BMP-2. Les cellules exprimant Thy-1 ont montré une augmentation de l'activité ALP. Elles ont formé des nodules minéralisés et induit la formation d'une matrice osseuse (Hosaya *et al.*, 2012). Ainsi, les cellules sous-odontoblastiques ont la capacité à se différencier en cellules synthétisant des tissus durs et par conséquent sont une source de cellules odontoblastiques. En conclusion, les odontoblastes et les cellules de la couche de Høehl sont tous deux impliqués dans la dentinogénèse. Ces cellules contribuent à la formation de dentine réactionnelle, tandis que les cellules pulpaire sont impliquées dans la formation de dentine réparatrice.

La couche de Høehl contient des cellules de défense ainsi que des cellules indifférenciées qui ont un potentiel de différenciation lors de situations pathologiques (Piette et Golberg, 2001).

#### 2.3.3.4. La zone centrale

Il s'agit du tissu pulpaire proprement dit. Elle contient le *stroma* conjonctif, des vaisseaux et des nerfs.

##### 2.3.3.4.1. Les cellules de la zone centrale

- Les fibroblastes

Ils représentent la principale population de cellules de la zone centrale du parenchyme pulpaire. Les fibroblastes sont des cellules présentes dans les tissus conjonctifs, appelés parfois cellules de soutien. Leur rôle est de former et de renouveler la matrice extra-cellulaire en synthétisant des fibres de collagène de type I et III, des protéoglycanes et des glycoprotéines. Ils participent aussi à sa destruction contrôlée (Simon *et al.*, 2008). Ils sont capables de synthétiser des cytokines en réponse à divers *stimuli*. Ils ont aussi un rôle dans la cicatrisation des lésions pulpaires en synthétisant par exemple des facteurs angiogéniques (Mathieu *et al.*, 2005).

Ils ont un aspect fusiforme ou épineux, possèdent un réticulum endoplasmique granulaire et un appareil de Golgi développé. Ils sont connectés les uns aux autres par des desmosomes et des jonctions communicantes (Piette et Goldberg, 2001).

- Les cellules immunitaires

La pulpe saine contient plusieurs types de cellules de défenses retrouvées principalement autour des vaisseaux sanguins : macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes, mastocytes et plasmocytes (Jontell *et al.*, 1987). Les macrophages et les cellules dendritiques représentent environ 8% de la population cellulaire, avec 1 macrophage pour 4 cellules dendritiques.

Dans la pulpe saine, les macrophages sont impliqués dans la phagocytose et l'élimination des cellules mortes et des corps étrangers. En cas d'agression bactérienne, ils vont activer la réponse immunitaire en présentant les antigènes aux lymphocytes (Piette et Goldberg, 2001). Ils éliminent ensuite les débris nécrotiques et les bactéries présents lors d'une inflammation (Simon *et al.*, 2008).

On trouve deux types de cellules dendritiques dans la pulpe saine : les cellules dendritiques CD11c+ situées à la jonction dentino-pulpaire dans la couche sous-odontoblastique de Höehl, et les cellules dendritiques F4/80+, situées autour des vaisseaux. Leur rôle, comme les macrophages, est

de présenter les antigènes qu'elles ont capturé aux lymphocytes afin de les activer. Ce sont des cellules très mobiles, qui forment un réseau entre elles grâce à leurs dendrites et interagissent avec les vaisseaux sanguins et les fibres nerveuses. Une fois activés, les lymphocytes retournent dans la pulpe lésée où ils assurent une « veille immunologique » en cas de nouvelle présentation de ces mêmes antigènes.

Les lymphocytes sont les cellules responsables de la réaction immunitaire spécifique. Les lymphocytes T sont peu nombreux dans la pulpe et leur présence indique une possible réaction immunitaire (Seltzer et Bender, 2002). Les lymphocytes B sont quant à eux rarement rencontrés (Farges et *al.*, 2003).

- Les cellules indifférenciées

Il s'agit de cellules souches mésenchymateuses mises en évidence en 2000 par l'équipe de Gronthos dans la pulpe de dents permanentes. Egalement appelées DPSC pour *Dental Pulp Stem Cells* (Gronthos et *al.*, 2000), elles sont les précurseurs de cellules différenciées. Elles peuvent se différencier en odontoblastes ou en fibroblastes selon les besoins du milieu (Lasfargues et Colon, 2010).

Des cellules souches, découvertes quelques années plus tard, existent aussi dans la pulpe des dents temporaires. Elles sont nommées SHED pour *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth* (Miura et *al.*, 2003).

- Les cellules endothéliales

Elles forment la paroi des vaisseaux sanguins et communiquent ensemble grâce à des desmosomes et des hémidesmosomes. Ce sont des cellules plates et polarisées. Leur pôle basal est en contact avec la membrane basale de l'endothélium. Elles permettent de conduire des métabolites. Les échanges de ces substances nutritives avec le milieu intérieur se font par le biais de ces cellules et de la membrane basale qui agissent comme un filtre moléculaire.

Lors de réactions inflammatoires et immunitaires, elles régulent les trajets des lymphocytes et des leucocytes. Ces derniers sont déformables et peuvent traverser l'endothélium.

Elles jouent aussi un rôle dans l'hémostase et dans le contrôle du tonus vasculaire.

Des cellules souches endothéliales existent, elles permettent la formation de nouveaux vaisseaux dans la pulpe saine comme dans des états pathologiques.

#### 2.3.3.4.2. La matrice extra-cellulaire

La matrice extra-cellulaire de la zone centrale est faite d'une substance fondamentale dans laquelle on retrouve des fibres de collagènes, des glycosaminoglycanes, des glycoprotéines, de l'élastine, des métalloprotéases matricielles (MMP) et des lipides (Piette et Goldberg, 2001 ; Nancy, 2003).

Elle permet des échanges de nutriments, de métabolites et de débris entre les cellules et les vaisseaux pulpaire (Walton et Torabinejad, 2001). Elle a une visco-élasticité importante qui lui permet de s'adapter aux variations de pression intrapulpaire lors de réactions inflammatoires (Simon *et al.*, 2008).

Les fibres de collagènes représentent 34% des protéines pulpaire. Les plus retrouvées sont les fibres de type I et III. Les types V, VII et IV sont également retrouvés en plus faible quantité. Le collagène est synthétisé par les fibroblastes décrits précédemment. Comme dans tout tissu conjonctif de l'organisme, le collagène a un rôle de support du tissu. Avec l'âge, la quantité de collagène augmente, on obtient donc une fibrose progressive (Piette et Goldberg, 2001).

Les glycosaminoglycanes constituent 50% des protéines matricielles pulpaire. On retrouve différents types :

- Chondroïtines sulfates 4 et 6,
- Dermatan sulfate,
- Kératane sulfate,
- Héparane sulfate (dans la membrane basale qui entoure les vaisseaux),
- Acide hyaluronique (en plus faible quantité).

Une fois la dent sur l'arcade, les proportions entre les différentes protéines changent : les dermatanes sulfates et l'acide hyaluronique sont en plus grande quantité (Piette et Goldberg, 2001). Ces protéines ont pour rôle d'assurer la rétention d'eau dans la pulpe (Lasfargues et Colon, 2010). La pulpe reste donc hydratée par le stockage des molécules d'eau.

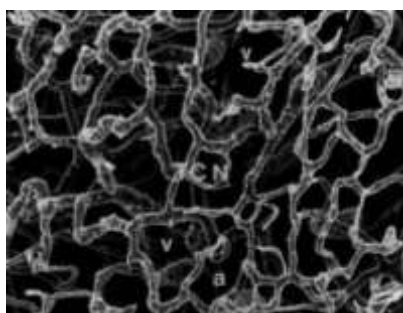
Les glycoprotéines permettent de lier les fibroblastes au réseau de collagène. C'est surtout la fibronectine, grâce à sa séquence arginine-glycine-aspartate qui parvient à se lier aux membranes cellulaires, ainsi qu'au collagène de type III. Elle a aussi un rôle dans le maintien de la morphologie des odontoblastes, dans leur différenciation terminale et dans les interactions entre ces cellules (Seltzer et Bender, 2003). On retrouve aussi des ténascines et des thrombospondines. La ténascine-X est une glycoprotéine capable d'interagir avec certains collagènes ainsi que des

protéoglycanes. La thrombospondine-1 joue un rôle important dans la régulation de l'activité protéasique matricielle de MMP2.

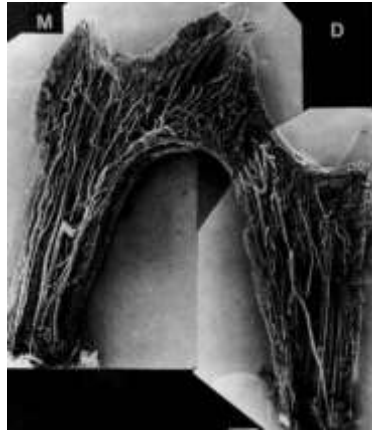
L'élastine est située le long de la paroi des vaisseaux sanguins et a pour but de rendre ces derniers élastiques (Piette et Goldberg, 2001).

### 2.3.3.5. La vascularisation pulpaire

La pulpe est un tissu très vascularisé (**Figures 14 et 15**). Les vaisseaux sanguins représentent 5% du volume pulpaire (Lasfargues et Colon, 2010). Les vaisseaux alvéolaires supérieurs et inférieurs donnent naissance aux artérioles qui pénètrent dans la dent par le milieu des foramens apicaux et secondaires. En général, on observe une seule, voire deux artérioles de 35 à 45µm de diamètre. A l'intérieur de la pulpe, on observe une arborescence des artérioles se terminant en capillaires. Ces derniers se ramifient pour former un fin réseau de capillaires sous-odontoblastiques, participant à la formation du plexus de Rashkow dans la zone acellulaire de Weil (Lasfargues et Colon, 2010). Le diamètre des capillaires est de 5 à 10µm, leur paroi est fine. A proximité des odontoblastes, ils sont fenestrés pour permettre un bon passage des nutriments ainsi qu'une meilleure régulation de l'inflammation pulpaire. Leur paroi, faite de cellules endothéliales, permet des échanges de nutriments, protéines et déchets entre le sang et la matrice extra-cellulaire (Nancy, 2003). Il existe d'autres vaisseaux plus petits qui pénètrent dans la pulpe par des canaux accessoires (Trubiani *et al.*, 2003). Le retour veineux se fait par le centre du foramen apical. Des veinules post-capillaires se regroupent pour former des veinules collectrices au milieu du canal radiculaire. Il existe des shunts qui permettent de réguler le débit sanguin et la pression intrapulpaire. Lors de lésions, des anastomoses se créent au besoin afin de dériver la circulation sanguine pour isoler la zone lésée (Piette et Goldberg, 2001).



**Figure 14.** Vaisseaux sanguins de la région coronaire observés au microscope électronique à balayage ; TCN=réseau de capillaires terminal ; a=artériole ; v=veinule (Inoki *et al.*, 2012).



**Figure 15.** Organisation de la vascularisation d'une première molaire de chien observée au microscope électronique à balayage ; M=mésial ; D=distal. La couche superficielle de capillaires a été retirée (Inoki *et al.*, 2012).

Selon certains auteurs, il y a présence d'un réseau lymphatique au sein du parenchyme pulpaire (Sawa *et al.*, 1998). Ces vaisseaux collectent la lymphe interstitielle dentinaire et sortent au niveau du foramen apical en se drainant vers les ganglions sous-mentonniers et sous-mandibulaires, puis en direction des ganglions cervicaux. Lors de réactions inflammatoires et infectieuses, les vaisseaux lymphatiques jouent un rôle important dans l'initiation de la réaction grâce aux lymphocytes ganglionnaires.

Ce système d'échange est très bien organisé. Cependant, la vascularisation est terminale dans un espace clos.

#### **2.3.3.6. L'innervation pulpaire**

Le parenchyme pulpaire est l'un des tissus les plus innervés du corps humain. Durant la dentinogénèse, des fibres nerveuses pénètrent par le foramen apical le long des vaisseaux sanguins et forment un faisceau neuro-vasculaire (Lasfargues et Colon, 2010). Des familles de molécules telles que NGF (*Nerve Growth Factor*), GDNF (*Glial cell line-derived Neurotrophic Factor*) et les sémaphorines permettent la mise en place du système nerveux dentaire (Pan *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2008). Le réseau reste immature jusqu'à la mise en fonction de la dent sur l'arcade.

Les fibres nerveuses transmettent la douleur au système nerveux central. Ce sont elles qui contrôlent les réponses inflammatoires et cicatricielles du complexe dentino-pulpaire (Lasfargues et Colon, 2010). Les fibres, après être entrées par le foramen apical, se ramifient dans la partie coronaire de la pulpe et participent avec les vaisseaux sanguins à la formation du réseau sous-

odontoblastique appelé plexus de Rashkow, situé dans la couche acellulaire de Weil (Piette et Goldberg, 2001 ; Bletsa *et al.*, 2009). Certaines fibres s'étendent même jusqu'au pôle apical des odontoblastes et pénètrent dans la dentine sur une distance pouvant aller jusqu'à 200 microns (Maeda *et al.*, 1987).

On trouve dans la pulpe des fibres sensibles et des fibres vaso-motrices sympathiques :

- les fibres sensibles sont issues du nerf trijumeau : les dents maxillaires sont innervées par le nerf maxillaire V2, et les dents mandibulaires par le nerf mandibulaire V3. La plupart des fibres nerveuses se terminent dans le plexus de Rashkow. On trouve 70 à 90% de fibres nerveuses amyéliniques de type C, responsables de la douleur. Ces terminaisons nerveuses sont des récepteurs de la douleur. Elles sont thermo- et chimio-sensibles et sont activées lors de l'inflammation pulpaire (Lasfargues et Colon, 2010). On trouve aussi des fibres myélinisées de type A- $\delta$  qui ont une vitesse de transmission plus élevée, avec un seuil d'excitation plus bas que les fibres C. Elles sont responsables de la douleur aiguë et le déplacement des fluides intracaniculaires les stimulerait. Des fibres A- $\beta$  myélinisées ont été mises en évidence et pourraient être responsables de la sensibilité dentino-pulpaire observée en réaction à des *stimuli* électriques, mécaniques, thermiques ou chimiques.
- les fibres vaso-motrices sympathiques sont originaires du ganglion cervical supérieur. Elles sont de deux types, vaso-constrictrices adrénergiques et vaso-dilatatrices cholinergiques. Leur rôle est de réguler le débit et le tonus vaso-moteur pulpaire.

### **3. Les cellules souches**

#### **3.1. Le concept des cellules souches**

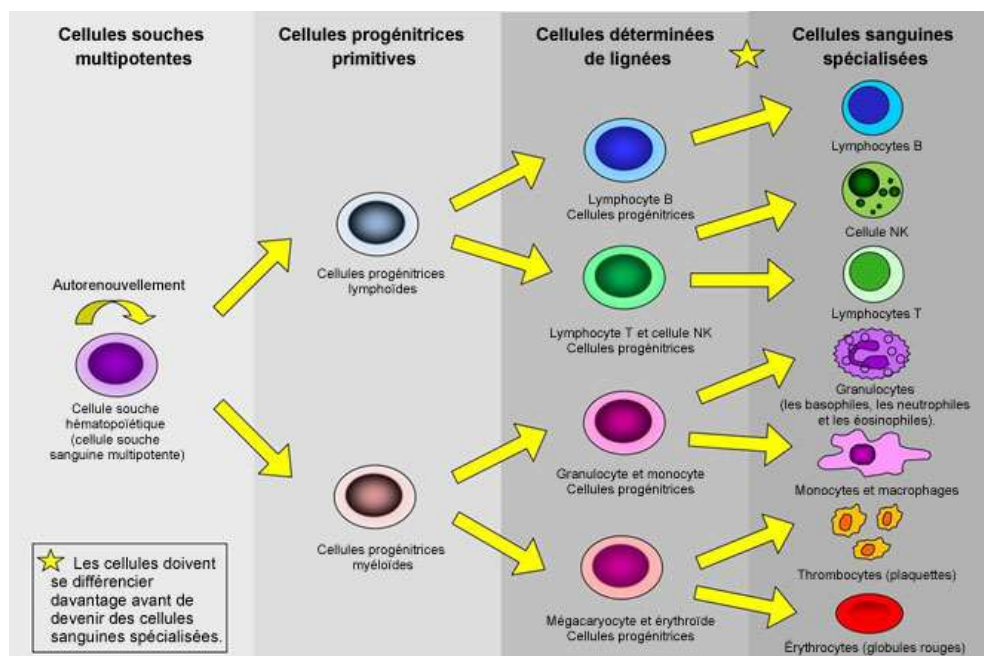
##### **3.1.1. Définition**

Une cellule souche est une cellule indifférenciée pouvant engendrer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et pouvant se maintenir par prolifération dans l'organisme tout en gardant le même patrimoine génétique. Les cellules souches sont présentes chez tous les êtres vivants multicellulaires : chez les espèces animales comme chez les plantes.

Une cellule souche est qualifiée de déterminée. Elle est immature mais programmée comme ancêtre d'un ou plusieurs types cellulaires.

### 3.1.2. Caractéristiques

Grâce à des signaux, la cellule souche entre en mitose. Une des cellules filles va rester indifférenciée, c'est sa capacité d'auto-renouvellement. La seconde va entamer irréversiblement un phénomène de différenciation. Une cellule souche est capable de deux types de divisions cellulaires : une asymétrique avec la production d'un progéniteur plus différencié, et une symétrique qui produit une cellule souche (**Figure 16**).



**Figure 16.** Auto-renouvellement et différenciation d'une cellule souche hématopoïétique en cellule progénitrice lymphoïde ou myéloïde (©Parions Sciences, 2013).

La création du progéniteur se fait en deux étapes. D'abord la cellule se différencie, ce qui est un changement qualitatif de phénotype. Par exemple, des gènes s'expriment et de nouvelles protéines s'activent. C'est un événement ponctuel. Puis la cellule entame sa maturation, ce qui est un changement quantitatif, avec une augmentation de la production de protéines. Cette phase est plus ou moins longue dans le temps.

La formation d'un tissu différencié comprend trois phases. En premier lieu, les cellules ne font que se diviser : soit elles se renouvellent, soit elles créent des cellules déterminées. Il s'agit de

prolifération sans différenciation. Puis, durant la phase intermédiaire, on retrouve à la fois mitose et différenciation/maturation. Les cellules sont de plus en plus différenciées tout en se divisant. Cette phase possède une durée très flexible dans le temps, selon le type de lignée cellulaire concerné (Smith, 2006).

### 3.1.3. Potentiel de différenciation

On distingue les cellules souches en fonction de leur potentiel de différenciation (Smith, 2006) :

- les cellules souches **totipotentes** : elles sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé jusqu'au jour 4. Elles ont le pouvoir de donner naissance aux trois feuillets embryonnaires, aux cellules germinales et au tissu placentaire. Elles ont la capacité de donner un individu entier.
- Les cellules souches **pluripotentes** : elles proviennent de la masse interne de l'embryon au stade blastocyste (jour 5 à jour 7 après la fécondation). Elles ont le pouvoir de donner naissance aux trois feuillets embryonnaires, aux cellules germinales mais ne peuvent pas donner un organisme entier.
- Les cellules souches **multipotentes** : elles sont hébergées dans les tissus foetaux, dans le sang de cordon ou les tissus adultes. Elles ont le pouvoir de donner plusieurs types de cellules dans un tissu donné car elles sont spécifiques d'un tissu. Il s'agit des cellules souches hématopoïétiques, des cellules souches neurales, ou des cellules ovales (hépatocytes, cellules des canaux biliaires).
- Les cellules souches **unipotentes** : elles sont hébergées dans les tissus foetaux, le sang de cordon ou les tissus adultes. Elles sont aussi appelées « progéniteurs » et ne peuvent former qu'un seul type cellulaire. Grâce à leur capacité d'auto-renouvellement, elles forment aussi une cellule souche indifférenciée, ce qui les différencie des cellules « précurseurs » qui, elles, ne se renouvellent pas. Il s'agit par exemple des érythroblastes qui se différencient en globules rouges, ou des myéloblastes qui se différencient en granulocytes.

Les cellules souches existent durant toute la vie d'un individu, mais on peut distinguer les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes.

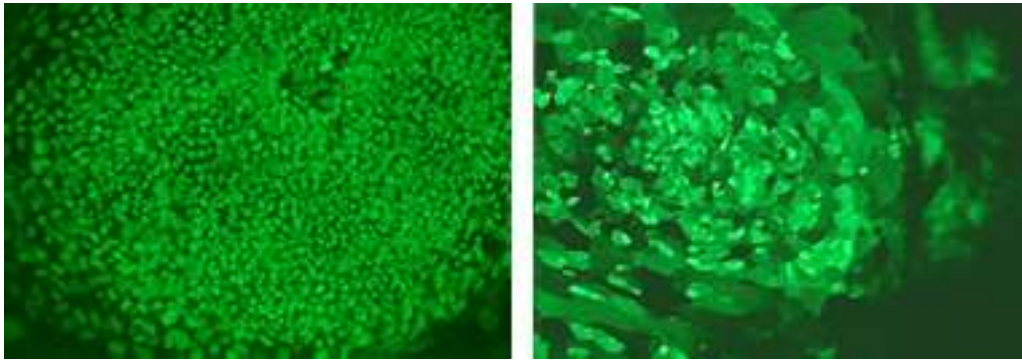
### 3.2. Les cellules souches pluripotentes embryonnaires (CSE)

Les cellules souches embryonnaires sont les cellules centrales du développement, puisqu'elles vont générer progressivement toutes les autres cellules de l'organisme, grâce à des étapes de différenciation et de prolifération finement orchestrées pour créer, finalement, un individu pluricellulaire viable. Les premières CSE isolées chez les mammifères l'ont été en 1981 à partir d'embryons de souris (Evans et Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Ce sont des « cellules mères ». Ces cellules proviennent de l'embryon humain aux tous premiers stades de son développement, quelques jours seulement après la fécondation. Elles peuvent être isolées à partir de plusieurs stades : du blastocyste à la lignée germinale adulte. Elles sont dites pluripotentes car elles peuvent se répliquer indéfiniment, proliférer en culture et se différencier en plus de 200 types de tissus. Elles ont vocation à former tous les tissus de l'organisme.

Les CSE sont utilisées dans le domaine de la pharmacologie, afin d'évaluer les effets biologiques de certains composés, avant de progresser vers des tests sur des modèles animaux plus onéreux. Elles sont exploitées en toxicologie prédictive, préoccupation essentielle des industries pharmaceutique et cosmétique. Afin d'étudier la toxicité développementale, les CSE se différencient en présence du médicament candidat et les effets sont observés : y a-t-il perturbation des mécanismes de différenciation, effets sur la prolifération, interférence avec des voies de signalisation cellulaire majeures, hépatotoxicité ou cardiotoxicité ? (Lemieux *et al.*, 2011).

Les recherches sur les CSE n'ont cessé de se développer en raison des enjeux thérapeutiques considérables qu'elles représentent (**Figure 17**). Elles pourraient en effet constituer un réservoir permanent de cellules pour réparer les organes malades ou endommagés. Dans certains cas, elles pourraient même remplacer la greffe d'organes.

Cependant, un obstacle majeur à l'épanouissement de ce domaine de recherche est la législation. En France, il aura fallu attendre 2004 pour que les chercheurs obtiennent l'accès aux cellules d'embryons humains dits surnuméraires.



**Figure 17.** La première lignée de cellules souches embryonnaires en France, dérivée en octobre 2007 à partir d'un embryon non viable. Ces cellules expriment deux marqueurs caractéristiques des cellules souches (OCT4 à gauche et TRA1-60 à droite) (© Unité INSERM 602).

### 3.2.1. Les iPSC (Induced Pluripotent Stem Cells) : cellules souches pluripotentes induites

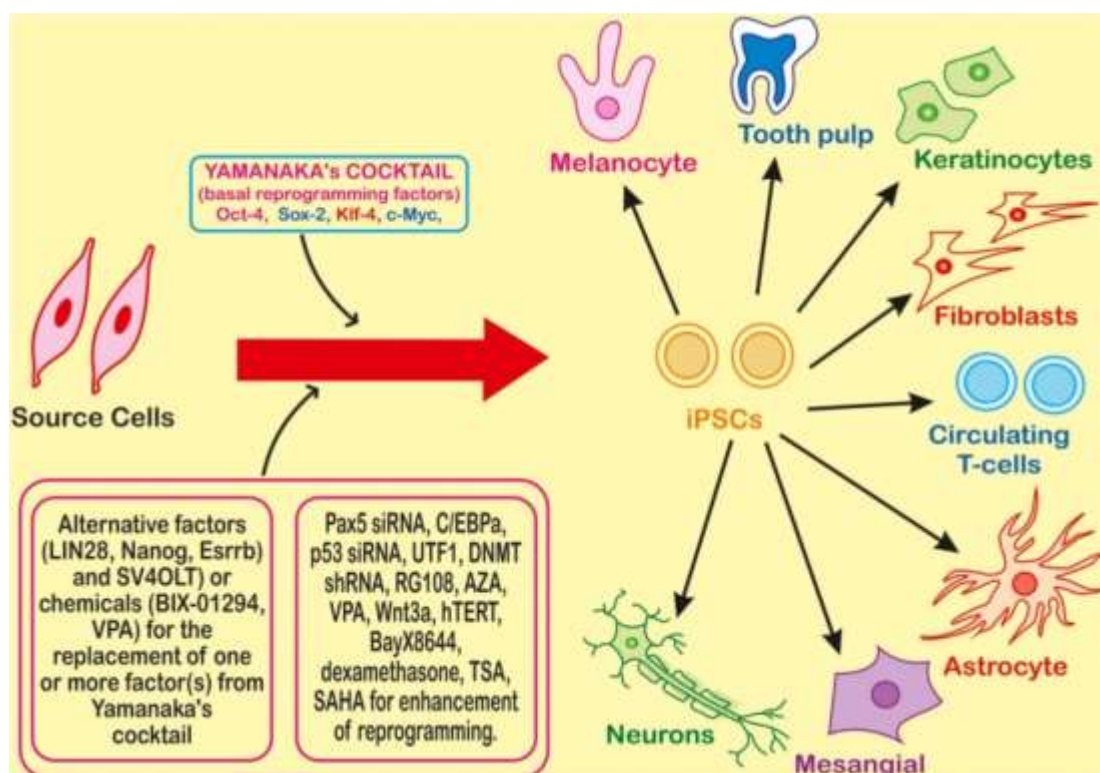
Les iPSC représentent un des plus grands espoirs pour la thérapie cellulaire. Grâce aux travaux de Shimya Yamanaka et John Gurdon (2006), prix Nobel de médecine en 2012, il est désormais possible de transformer une cellule spécialisée en cellule immature capable de redonner n'importe quel autre tissu de l'organisme. Les iPSC sont identiques aux CSE, mais obtenues par reprogrammation de fibroblastes de cellules adultes différenciées. Leur morphologie est semblable et elles expriment les mêmes marqueurs de pluripotence comme Oct4, Sox2, Nanog (Takahshi et Yamanaka, 2006).

Elles sont obtenues par surexpression de quatre gènes suffisants et nécessaires (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*) dans des fibroblastes. La technique est de faire pénétrer ces quatre gènes dans la cellule adulte pour qu'ils s'expriment, ainsi qu'un rétrovirus comme catalyseur de réaction. A ce moment, la cellule acquiert la pluripotence, pouvant ainsi se différencier en l'un des trois lignages embryonnaires. Le fait d'activer la pluripotence éteint les autres gènes de différenciation exprimés par la cellule. Les vecteurs utilisés pour intégrer la cellule sont des plasmides (Okita *et al.*, 2010) ou le virus de Sendai (Ban *et al.*, 2001), qui finissent par se perdre au cours des divisions. Un plasmide est une unité de réplication autonome retrouvée dans une bactérie. C'est un ADN circulaire double brin qui n'est pas indispensable au métabolisme de la cellule hôte. Par expériences de recombinaison *in vitro*, un fragment d'ADN est intégré dans le plasmide. On obtient un plasmide recombiné. Une fois le fragment d'ADN cloné dans le plasmide, les gènes s'expriment dans la cellule par transcription et traduction du messenger. De même, le virus de Sendai recombiné est un vecteur servant à introduire des gènes dans des cellules. Les fibroblastes

sont les cellules les plus utilisées pour ces recherches, car faciles d'accès. Mais toute cellule adulte qui prolifère peut être utilisée pour cette reprogrammation.

Des cellules iPSC ont aussi été obtenues à partir de cellules souches pulpaire (DPSC : *Dental Pulp Stem Cells*) (Yan *et al.*, 2010). Ceci représente une avancée pour la recherche en pharmacologie et toxicologie employant les iPSC car les DPSC sont facilement accessibles. En effet on peut se procurer les DPSC à partir de dents extraites en raison d'une maladie parodontale ou autre, de telle sorte qu'elles peuvent être largement utilisées comme source de cellules somatiques pour les banques de cellules iPSC (Tezuka *et al.*, 2008).

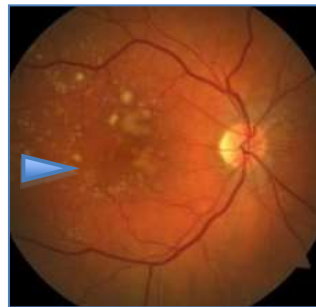
Les iPSC présentent des avantages par rapport aux CSE. Une simple biopsie chez l'adulte permet d'y avoir accès (**Figure 18**). Le risque de rejet de greffe est écarté et les utiliser ne pose pas de problème éthique. Cependant, les iPSC sont instables génétiquement. La reprogrammation induirait-elle des mutations ou des modifications génétiques pouvant par la suite altérer le fonctionnement des iPSC ?



**Figure 18.** L'introduction des quatre facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc) permet de reprogrammer une cellule somatique en iPSC qui peut ensuite se différencier en plusieurs types de cellules. Plusieurs facteurs sont capables de remplacer un des quatre facteurs de base requis. Pour catalyser la reprogrammation, d'autres molécules sont utilisées (Singh *et al.*, 2015).

### 3.2.2. Exemple : CSE et DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge)

Des cellules souches découvertes dans la rétine d'individus adultes décédés ouvrent une nouvelle piste sur le traitement de l'une des premières causes de cécité, la DMLA. La DMLA touche 25 millions de personnes dans le monde. Cette maladie cause la destruction des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (**Figure 19**).



**Figure 19.** Rétine atteinte de DMLA. Les taches jaunes indiquent la présence de déchets non éliminés sur la macula (flèche) (Dr Serny).

Les cellules souches découvertes dans la rétine sont des cellules souches à caractère multipotent. La piste explorée par plusieurs équipes consiste à greffer dans la rétine des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine produites à partir de CSE ou de cellules iPSC. Le but des chercheurs est d'élucider le mécanisme qui permet de différencier des cellules souches multipotentes en cellules de l'épithélium pigmentaire, afin d'activer *in situ* la régénération de l'épithélium défectueux.

En 2012, la première greffe de CSE a été réalisée chez deux patientes atteintes de DMLA. Après prélèvement sur un embryon humain, ces cellules sont mises en culture et se développent indéfiniment. 50000 d'entre elles sont sélectionnées et injectées sous la rétine des patientes très malvoyantes. Six mois plus tard, l'un d'elles pouvait à nouveau se déplacer seule, l'autre parvenait à se servir partiellement d'un ordinateur. Mais ces résultats doivent être confirmés sur la durée (Schwartz *et al.*, 2012).

Au Japon, le 12 septembre 2014, une femme de 70 ans atteinte de DMLA a reçu un implant de tissu rétinien obtenu à partir de cellules iPSC. Même s'il est encore trop tôt pour évaluer le résultat, la patiente a déclaré au lendemain de l'opération que sa vue était « plus brillante ». Les cellules iPSC en questions étaient des cellules souches obtenues à partir de cellules adultes différenciées (de la peau de la patiente) reprogrammées en cellules de rétine. L'équipe japonaise a

implanté un feuillet de 1,3x3mm d'épithélium rétinien dans l'œil de la patiente. Les résultats sont attendus dans deux ans (Takahashi *et al.*, 2014).

### **3.3. Les cellules souches multipotentes adultes**

Les cellules souches multipotentes sont retrouvées en très faible quantité dans les tissus adultes. Elles sont rares. Elles n'ont pas autant de potentiel que les CSE étant donné qu'elles sont engagées dans une certaine direction. Elles sont déjà déterminées mais elles ont, comme toutes les cellules souches, la capacité à s'auto-renouveler et se différencier en plusieurs types de tissus. Elles sont dites multipotentes. Elles sont présentes dans tous les tissus, sont responsables du renouvellement cellulaire ainsi que de la réparation des tissus après une lésion.

#### **3.3.1 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)**

Une cellule souche hématopoïétique est un type de cellule à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines, qui intervient lors de l'hématopoïèse : les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Leur existence a été démontrée par la reconstitution d'une hématopoïèse à long terme dans un modèle de souris létalement irradiées (Till et McCulloch, 1961). Les CSH ont un caractère multipotent (Spangrude *et al.*, 1988). Elles peuvent donner n'importe quel type cellulaire du sang provenant des lignages myéloïde et lymphoïde tout au long de la vie d'un individu. Elles sont responsables du maintien de la production des cellules du sang.

Les CSH sont contenues dans la moelle osseuse et sont peu nombreuses : leur fréquence est inférieure à 1% des cellules de la moelle osseuse (Morrison *et al.*, 1995). Elles sont pour la plupart quiescentes : elles sont ainsi protégées lors des traitements par chimiothérapie. Dans certains cas, on peut proposer un traitement avec greffe de CSH (allogreffe ou autogreffe). Le but est de remplacer les cellules malades par des cellules saines. Elles sont utilisées dans des transplantations de moelle osseuse pour le traitement des maladies du sang et dans certains cas de cancers.

Chez les nouveaux-nés, des CSH sont en plus contenues dans le sang de cordon (Knutson, 1974). Il s'agit du sang présent dans le placenta et dans le cordon ombilical. Il présente un intérêt particulier en médecine régénérative. Le sang du cordon est collecté après la naissance de nombreux enfants dans un nombre croissant de pays, et cela sans aucun risque pour la mère et

l'enfant. Il est prélevé et analysé pour quantifier le nombre de globules blancs et de cellules souches qu'il contient. S'il répond à certaines conditions (variables selon les pays et les évolutions de la législation), ce sang de cordon est conservé pour utiliser les cellules souches qu'il contient. C'est une bonne alternative aux transplantations de moelle osseuse dans certain cas, car il est plus simplement collecté que la moelle osseuse, et se congèle plus facilement.

En France environ 30% des cordons répondent à ces critères et sont conservés. Les parents peuvent faire don du sang de cordon à une banque publique de sang placentaire, afin qu'il puisse être utilisé pour sauver la vie d'un enfant ou d'un adulte, principalement dans certains cas de cancers. Les CSH du sang de cordon sont utilisées pour traiter des enfants atteints de leucémies, ou de maladies génétiques du sang (anémie de Fanconi) (Thillay, 2007).

### **3.3.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)**

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules au caractère multipotent trouvées à l'origine dans la moelle osseuse. Elles ont été identifiées en 1966 dans le compartiment stromal de la moelle osseuse. Elles peuvent produire plus d'un type de cellules spécialisées mais pas tous les types. Leur proportion dans la moelle osseuse est très faible : elles représentent 0,001 à 0,01% des cellules de la moelle osseuse. D'autres recherches ont montré qu'elles sont présentes dans une grande variété de tissus tels que le sang de cordon, le tissu adipeux et les muscles.

Elles ont la capacité de produire les différentes cellules spécialisées présentes dans les tissus squelettiques lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu défini : l'os (ostéoblastes), le tissu adipeux (adipocytes) et le cartilage (chondrocytes) (Bianco *et al.*, 2001).

Il est assez facile d'obtenir un mélange de différents types de cellules contenant des CSM de la moelle osseuse d'un adulte, mais isoler la fraction minuscule des CSM est plus compliqué. Certaines des cellules de ce mélange peuvent être en mesure de former de l'os ou des tissus adipeux par exemple, mais n'ont pas encore toutes les propriétés des CSM. Le défi consiste à identifier et à sélectionner les cellules qui peuvent à la fois s'auto-renouveler et se différencier en trois types de cellules : os, graisse et cartilage. Les scientifiques n'ont pas encore atteint un *consensus* sur la meilleure façon de le faire.

Les CSM sont des cellules de soutien de l'hématopoïèse en fournissant aussi bien un support physique pour les CSH, que les cytokines nécessaires à leur différenciation (Ringden *et al.*, 2005).

A ce jour, il n'existe pas de traitement disponible utilisant les CSM. Cependant, plusieurs possibilités d'exploitation sont à l'étude.

La capacité des CSM à se transformer en ostéoblastes a conduit la recherche vers des traitements possibles pour des défauts localisés squelettiques (dommages à un endroit particulier de l'os). D'autres recherches ont conduit à les utiliser pour réparer du cartilage articulaire endommagé en les injectant au patient.

La moelle osseuse sert de réservoir pour les CSM qui seraient capables d'être mobilisées et acheminées par voie sanguine vers les sites lésés pour participer à la réparation tissulaire (Qiling *et al.*, 2009). Ainsi, les chercheurs étudient la possibilité que des CSM transplantées libèrent des substances qui envoient des signaux aux propres cellules du patient pour réparer les dommages.

Cependant, de nombreux obstacles demeurent avant que ces thérapies cellulaires puissent devenir une réalité. En effet lors de transplantations de CSM, la plupart sont éliminées par le corps. Les chercheurs travaillent sur des nouvelles techniques de transplantation basées sur des structures tri-dimensionnelles : les supports (*scaffolds*). Ces derniers imitent les conditions dans la partie du corps où les cellules sont nécessaires. Ils permettent de tenir les cellules et de les encourager à se différencier.

### **3.4. Les cellules souches dentaires**

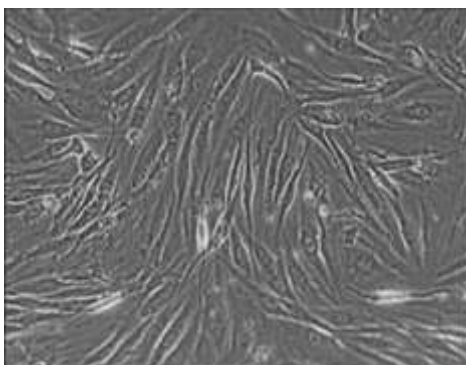
#### **3.4.1. Les cellules souches pulpaire (DPSC)**

##### **3.4.1.1. Découverte**

La capacité d'une dent à répondre à un *stimulus* par formation de dentine réparatrice laisse supposer la présence de cellules progénitrices mobilisées en cas d'agression. Identifier et étudier ces cellules recrutées est impératif afin de trouver des stratégies alternatives au coiffage pulpaire et à l'endodontie en utilisant des cellules souches.

C'est ainsi que des cellules souches pulpaire ont été mises en évidence par l'équipe de Gronthos *et al.* (2000) dans la pulpe de dents permanentes (**Figure 20**). Le terme de DPSC leur est donné, pour *Dental Pulp Stem Cells*. Les chercheurs ont isolé ces cellules, les ont réimplantées dans des souris immunodéprimées afin d'éviter le risque de rejet immunitaire et ont observé que ces cellules fabriquaient une structure dentinaire entourée de cellules odontoblastiques qui

bordaient un tissu interstitiel de type tissu pulpaire (Gronthos *et al.*, 2000). Ce sont des cellules souches mésenchymateuses.



**Figure 20.** Cellules souches mésenchymateuses de pulpe dentaire en culture (Shekar et Ranganathan, 2012).

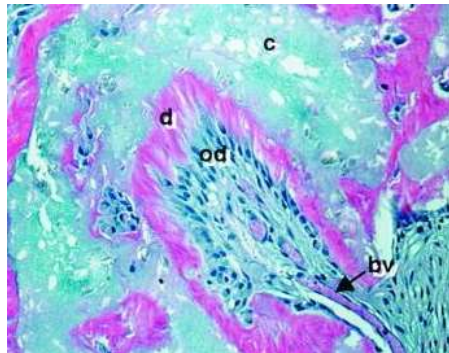
Afin de montrer l'existence de cellules souches dans la pulpe, la méthodologie appliquée dans cette étude a été celle utilisée précédemment lors de l'isolation et de la caractérisation des BMSC (*Bone Marrow Stem Cells*) : les cellules souches de la moelle osseuse, précurseurs des ostéoblastes.

Gronthos et son équipe ont utilisé des dents de sagesse incluses de patients âgés de 19 à 29 ans. Ils ont coupé la dent au niveau de la jonction émail-cément pour accéder à la chambre pulpaire (Gronthos *et al.*, 2000).

Ensuite, le tissu pulpaire est isolé et digéré pendant une heure dans une solution à 37°C contenant de la collagénase et de la dispase. Les cellules seules sont récupérées grâce à un filtre. Puis elles sont plongées dans une solution avec de l'acide ascorbique, de la glutamine, de la streptomycine et de la pénicilline à 37°C dans 5% de CO<sub>2</sub>. Au jour 14, afin d'évaluer les colonies formées, les cultures sont fixées dans du formol et teintées au bleu de toluidine. Tous les agrégats de plus de 50 cellules sont considérés comme étant des colonies. Des marqueurs sont utilisés, pour la plupart communs aux BMSC (comme Oct3/4, CD90, STRO1), afin de caractériser les DPSC. Les marqueurs servent ensuite à sélectionner les cellules souches grâce à des anticorps fixés à des billes (IgG, TUK4, QBEND, etc...). Les cellules souches sont mélangées avec de l'hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) et transplantées dans la partie dorsale de souris immunodéprimées âgées de 10 semaines.

Au bout de 6 semaines, les transplants sont récupérés et fixés dans du formol, puis décalcifiés, tamponnés dans 10% d'EDTA (Ethylène Diamine Tétracétique), et intégrés dans de la

paraffine. Des coupes de 5  $\mu$ m sont ensuite déparaffinées et colorées à l'hémalun/éosine (**Figure 21**). Les brins d'ADN obtenus par transcription inverse à partir de l'ARN sont dilués dans une réaction de PCR (*Polymérase Chain Reaction*). Après amplification, les résultats de la PCR sont analysés par électrophorèse et visualisés grâce à la coloration de bromure d'éthidium.



**Figure 21.** Développement des transplants après 6 semaines *in vivo* ; coloration hémalun/éosine ; od : odontoblastes ; d : matrice dentinaire ; c : HA/TCP ; bv : vaisseaux sanguins (Gronthos *et al.*, 2000).

Les transplants de DPSC sont caractérisés par une couche d'odontoblastes alignés qui expriment la DSPP (*Dentin Sialo PhosphoProtein*), marqueur spécifique des odontoblastes. Leurs prolongements sont orientés dans la même direction et s'étendent aux canalicules de la dentine nouvellement créée (Gronthos *et al.*, 2000).

#### 3.4.1.2. Caractéristiques phénotypiques des DPSC

Les DPSC sont de grandes cellules fusiformes à grand noyau central, avec un cytoplasme volumineux.

Les cellules souches de la moelle osseuse sont les plus étudiées, depuis des années, car elles sont facilement accessibles, ce qui facilite la comparaison avec les cellules souches pulpaire. Ces deux types de cellules, quoique localisés à différents endroits dans le corps, ont beaucoup de traits en commun qui font d'eux des cellules souches somatiques post-natales.

Tout d'abord, les progéniteurs pulpaire peuvent former des colonies cellulaires. Mais les tissus dentaires sont des tissus spécialisés qui ne vont pas subir un renouvellement permanent, contrairement au tissu osseux. Dans l'étude menée par Gronthos et son équipe en 2000, le taux de prolifération des colonies est plus élevé pour les DPSC que pour les BMSC *in vitro*. Ceci s'explique

par le fait que les troisièmes molaires sont à un stade de développement inférieur à celui des os adultes utilisés.

Les DPSC ont un modèle d'expression des protéines similaire à celui des BMSC. Leurs phénotypes immuns sont semblables (**Tableau 1**). Les voies de signalisation impliquées dans la différenciation des DPSC en odontoblastes sont très proches de celles impliquées dans la différenciation des BMSC en ostéoblastes fonctionnels (Shi *et al.*, 2003). Elles expriment toutes deux des marqueurs de cellules endothéliales (MUC-18), de muscles lisses ( $\alpha$ -actinine) et d'os (ALP, ostéopontine) (Gronthos, 2000).

**Tableau 1.** Analyse immunohistochimique des DPSC et BMSC *in vitro* (Gronthos *et al.*, 2000).

Marqueur	DPSC	BMSC
CD14	–	–
CD34	–	–
CD44	++	++
CD45	–	–
Integrin $\beta$ 1	++/+	++
VCAM-1	+	++
MyoD	–	–
$\alpha$ -SM actin	++/–	++/+/–
Neurofilam.	–	–
MUC-18	++/–	++/+/–
Collagen-I	+	++/+
Collagen-II	–	–
Collagen-III	++/+	++/+
Osteocalcin	++/+	+/–
Osteonectin	++/+	++/+
BSP	–	+/–
Osteopontin	+/–	+/–
Alk Phos	++/+/–	++/+/–
PPAR $\gamma$	–	–
FGF-2	++/+	++/+

De puissants régulateurs de formation osseuse tels que TGF- $\beta$ , BMP-2, BMP-4 sont impliqués dans le développement des odontoblastes. D'autres facteurs de croissance régulent la prolifération et la différenciation des précurseurs des odontoblastes, comme EGF (*Epidermal Growth Factor*), IL- $\beta$ 1, ou TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*). Les DPSC et BMSC expriment les mêmes protéines matricielles minéralisées (DMP 1, fibronectine, collagène de type I, ostéonectine, ostéopontine, ostéocalcine, BSP) (Gronthos, Mankani *et al.*, 2000). Deux exceptions notables : la sialoprotéine dentinaire (DSP) et la phosphoprotéine dentinaire (DPP), qui sont spécifiques des

odontoblastes et regroupées sous le terme de DSPP (*dentin sialophosphoprotein*). L'expression simultanée de la DSP et de la DPP se produisant après la formation de la matrice pré-dentinaire collagénique participe au processus de dentinogenèse.

Enfin, un niveau d'expression des gènes similaire entre DPSC et BMSC a été découvert. Il a été montré que plus de 4000 gènes humains connus sont communs aux deux types de cellules souches (Menicanin *et al.*, 2010).

### **3.4.1.3. Différenciation des DPSC**

Les processus de prolifération et de différenciation des cellules souches sont permis grâce à l'activité de transcription des gènes, qui est régulée par les facteurs de transcription. Ces derniers modifient l'expression des gènes et fournissent des informations sur les fonctions cellulaires. La transcription des gènes est réalisée grâce à l'activité de l'ARN polymérase. Pour initier la transcription, des protéines propres à chaque type de cellules sont exprimées.

Le pré-requis pour la différenciation est l'existence d'un état indifférencié, maintenu par l'existence de facteurs de croissance, de cytokines, de contacts intercellulaires, de matrice extra-cellulaire (Cheng *et al.*, 2000). Tous ces éléments regroupés forment ce que l'on appelle une « niche de cellules souches », qui permet de les garder indifférenciées. Ce micro-environnement local est un support physique ainsi qu'une interface dynamique qui permet des échanges avec les cellules et les molécules qui l'entourent (Schofield, 1978).

C'est à l'intérieur de la niche que la cellule souche va se diviser de manière asymétrique. Les recherches récentes ont permis de montrer qu'il existe deux grands modèles de niches de cellules souches. Il y a les niches permanentes, retrouvées tout au long de la vie d'un organisme et les niches transitoires qui ne sont présentes qu'à un moment donné de la vie.

Pour amener une cellule souche à se différencier en tel ou tel type cellulaire, il faut ajouter à la culture certains facteurs comme des molécules de signalisation, afin de mimer les signaux moléculaires reçus au cours du développement de l'organisme.

#### **3.4.1.3.1. Différenciation en cellules neuronales**

Les DPSC sont retrouvées dans la zone péri-vasculaire de la pulpe dentaire et proviendraient de migration de cellules de la crête neurale. De ce point de vue, les cellules

souches dérivées de cet ectomésenchyme devraient posséder différentes caractéristiques apparentées aux cellules des crêtes neurales. Les cellules issues de crêtes neurales se différencient en plusieurs types de cellules, dont les neurones du système nerveux périphérique. Il a été démontré que les DPSC, une fois plongées en milieu neuronal *ex-vivo* adéquat (en présence de facteurs connus pour initier la différenciation des précurseurs neuronaux), acquièrent une morphologie de neurone et expriment les marqueurs neuronaux spécifiques au niveau des gènes et des protéines (Arthur *et al.*, 2008). La culture, *in vitro*, de cellules neuronales fonctionnelles à partir de DPSC a également été démontrée. De cette façon, les DPSC pourraient constituer une source facilement accessible de cellules progénitrices ayant le potentiel d'être utilisées pour traiter les maladies neurologiques.

Une étude menée par Huang (2008) laisse suggérer que les DPSC ont un potentiel thérapeutique, notamment en tant que stimulateur et modulateur de la réparation locale dans le système nerveux central. Huang et son équipe ont prélevé des cellules souches issues de la pulpe dentaire sur des dents de singes et les ont greffées dans l'hippocampe de souris immunodéprimées. Les cellules souches sont Rhésus indifférenciées et non traitées. Elles sont semblables à celles de l'homme : elles expriment les mêmes marqueurs (Nanog, Rex-1, Oct-4), les mêmes antigènes de surface et sont multipotentes. L'implantation de ces cellules souches dans l'hippocampe a stimulé la prolifération de cellules neuronales et a entraîné le recrutement de cellules progénitrices neurales et de neurones matures. Bien que le greffon de cellules souches ait une durée de vie courte, ses effets sont révélés à long terme par la sécrétion de facteurs de croissance. Jusqu'à 30 jours après l'implantation, les expressions de CNTF (*Ciliary NeuroTrophic Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et FGF sont renforcées. Cette opération a donc permis la prolifération, le recrutement et la maturation de progéniteurs endogènes par modulation du micro-environnement local.

#### **3.4.1.3.2. Différenciation en lignée mésodermique**

Comme toutes les cellules souches mésenchymateuses, les DPSC se différencient en cellules de la lignée mésodermique, telles que les ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, les myocytes et cardiomyocytes (Gronthos, 2011). Les protocoles ou recettes classiques pour obtenir la différenciation des cellules souches en une certaine lignée sont présentés dans le tableau 2 :

**Tableau 2.** Milieu de culture nécessaire pour obtenir la différenciation des cellules souches en ostéoblaste, chondrocyte ou adipocyte.

	Composition du milieu de culture
Ostéoblaste	DMEM-LG ( <i>low glucose</i> ) supplémenté de 10% FBS ( <i>Fetal Bovine Serum</i> ) 100nM dexaméthasone 0,2nM acide ascorbique 10mM glycérophosphate
Chondrocyte	DMEM-hig glucose 10ng/mL TGF- $\beta$ 3 100nM dexaméthasone 50 $\mu$ g/mL acide ascorbique 1mM sodium pyruvate 6,25 $\mu$ g/mL insuline 6,25 $\mu$ g/mL transferrine 6,25 $\mu$ g/mL acide sélénieux 1,25mg/mL sérum d'albumine bovin 5,35mg/mL acide linoléique
Adipocyte	DMEM-LG supplémenté à 10% FBS 1 $\mu$ M dexaméthasone 500 $\mu$ M IBMX (IsoButyl Méthyl Xantine) 60 $\mu$ M indométacine 5 $\mu$ g/mL insuline

Le DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) est un milieu de culture cellulaire utilisé pour l'apport d'éléments nutritifs nécessaire au maintien et à la prolifération de différents types de cellules *in vitro*. Le DMEM est une variation du EMEM (*Eagle's Minimal Essential Medium*). L'EMEM a été mis au point par Harry Eagle. Il contient des acides aminés, des sels, du glucose et des vitamines (acide folique, nicotinamide, riboflavine, B12). Le DMEM contient quatre fois plus de vitamines et d'acides aminés et deux fois plus de glucose que l'EMEM. Il contient en plus du fer. C'est un milieu approprié pour presque tous les types de cellules (humaines, singe, rat, souris, poisson, etc...).

La dexaméthasone (Dex) est un glucocorticoïde utilisé pour induire la minéralisation. La Dex agit sur les cultures cellulaires en inhibant la prolifération cellulaire, en stimulant l'activité ALP et en induisant l'expression d'un des marqueurs de la différenciation odontoblastique (DSPP). La Dex a un pouvoir ostéo-odontoinducteur sur les cellules pulpaire (Alliot-Licht *et al.*, 2005).

L'ALP est un mécanisme cellulaire impliqué dans la différenciation ostéo-odontogénique. C'est un marqueur phénotypique de la différenciation ostéogénique (Goseki *et al.*, 1990).

#### **3.4.1.3.3. Différenciation en lignée endodermique**

Les DPSC sont capables de se différencier en cellules de la lignée endodermique, telles que les cellules hépatiques (Iohara *et al.*, 2006). Une fois les cellules souches pulpaire humaines transplantées dans des tissus hépatiques défectueux de rats, les fonctions primaires des cellules de foie ont été restaurées et mises en évidence par la mesure de marqueurs hépatiques dans le sérum (bilirubine, albumine, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase) (Ikeda *et al.*, 2008).

#### **3.4.1.3.4. Cardiologie et circulation sanguine**

Les DPSC sont une nouvelle source de cellules pour la thérapie cellulaire cardiaque, elles permettent la régénération tissulaire (Iohara *et al.*, 2008). Des DPSC greffées chez des souris souffrant d'ischémie se sont développées et ont exprimé des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF-A, G-CSF, GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) et MMP3 (*Matrix MetalloProteinase*). Les DPSC possèdent les mêmes marqueurs de vascularisation que des cellules souches issues d'un prélèvement de moelle osseuse. Elles représentent en plus une alternative à la biopsie pour prélever des cellules souches.

Une autre étude de Gandia *et al.* (2008) a montré que les DPSC pourraient être une population de cellules autologues utilisables pour réparer les dommages des tissus cardiaques. Des DPSC ont été cultivées *in vitro* et marquées par fluorescence. Elles ont été injectées dans le myocarde de rat ayant été stimulé par déficience cardiaque par ligature de l'artère coronaire. Au bout de 4 semaines, les tissus défectueux ont récupéré un certain pourcentage de contractions. Les cellules souches transplantées ne se sont pas différenciées en cellules cardiaques, mais le nombre de vaisseaux sanguins a augmenté de manière significative. Le résultat est équivalent à celui obtenu après une greffe de cellules souches issues de moelle osseuse.

#### **3.4.1.3.5. Cornée**

Des données suggèrent que les DPSC des dents humaines partagent les caractéristiques semblables avec les cellules souches du limbe de l'œil et pourraient être employées comme nouvelle source de cellules pour la reconstruction cornéenne. Les cellules du limbe de l'œil sont

des cellules fortement prolifératives *in vitro*, qui expriment un ensemble de marqueurs spécifiques et ont *in vivo* la capacité de reconstruire l'épithélium cornéen entier suite à un dommage extérieur oculaire. Il a été démontré chez le lapin par analyse morphologique et immuno-histochimique, en utilisant les anticorps humain-spécifiques contre l'épithélium du limbe et de la cornée, que les DPSC sont capables de reconstruire la surface de l'œil après induction (Monteiro *et al.*, 2014).

#### **3.4.1.3.6. Différenciation en odontoblastes**

*In vivo*, les DPSC sont capables de se différencier en plusieurs types de cellules pulpaire, dont les cellules odontoblastiques permettant de synthétiser de la dentine (Yu *et al.*, 2006). Cette partie est développée par la suite. Les travaux de Magloire présentent les techniques d'ingénierie tissulaire utilisant les cellules souches pour obtenir une « dent biologique » (Magloire *et al.*, 2004).

#### **3.4.1.4. Les niches de cellules souches**

Dans les tissus sains, les cellules souches sont retrouvées dans un environnement spécifique qu'est la « niche ». Comme vu précédemment, une niche est un micro-environnement de soutien physiologique pour les cellules souches (Schofield, 1978).

Les niches de cellules souches sont des domaines fonctionnels dynamiques qui influencent le comportement des cellules souches afin de maintenir l'homéostasie sous diverses conditions physiologiques et pathologiques. La niche est modulable pour coordonner le comportement des cellules souches avec l'homéostasie et la réparation. L'idée que des environnements spécialisés au sein des tissus puissent préserver le potentiel de prolifération et bloquer la maturation des cellules souches adultes était la première hypothèse concernant les niches de cellules souches. Retirer les cellules souches de la niche mène à la perte de l'identité des cellules, de leur capacité d'auto-renouvellement et du début de différenciation. Ainsi, la niche permet d'équilibrer la production de cellules souches et de progéniteurs pour maintenir l'homéostasie. Une niche n'est pas seulement définie comme la présence de cellules souches à un endroit donné mais aussi comme la capacité à réguler le comportement des cellules souches (Voog et Jones, 2010).

Le concept de niche implique plusieurs facteurs dans un espace multidimensionnel. Elle est le siège d'interactions entre des cellules souches et des cellules avoisinantes, des molécules d'adhésion, des composants de la matrice extra-cellulaire (MEC), des facteurs de croissance, des

cytokines, des éléments physicochimiques comme le pH, des ions et des métabolites (Schraufstatter *et al.*, 2011).

Répliquer une niche *in vitro* permettrait d'obtenir des conditions prédictives et contrôlables pour les thérapies régénératives. Mais jusqu'à présent il n'y a pas de condition de culture disponible.

Le tissu pulpaire est surtout d'une nature hétérogène. Cela laisse supposer que la zone sous-odontoblastique et la zone riche en cellules de la pulpe contiennent des DPSC, étant donné que ces zones sont plus sujettes à des attaques provenant des canalicules dentinaires. D'un autre côté, ces zones sont aussi sujettes à la destruction lors de caries à un stade avancé. Ainsi, la situation la plus sûre pour des DPSC serait la pulpe elle-même, dans la zone centrale, notamment en périphérie des artérioles principales.

Les DPSC semblent résider dans la zone centrale de la pulpe d'une manière quiescente. Lorsqu'elles entrent en cycle grâce à des signaux, elles se divisent de manière asymétrique. Des expériences de marquage avec la thymidine tritiée montrent que pendant que les cellules marquées retrouvées à côté de la zone blessée sont celles qui ont permis la différenciation odontoblastique et la migration vers le site blessé, les autres cellules-filles qui sont les copies exactes des cellules-mères résident dans la pulpe en attendant le prochain signal (Fitzgerald *et al.*, 1990).

Les cellules recrutées pour la cicatrisation pulpaire peuvent être localisées à n'importe quel endroit de la chambre pulpaire (Fitzgerald, 1979 ; Yamamura, 1980 ; Tziafas et Kolokuris, 1990). Il a été montré que les cellules positives pour STRO1 (marqueur stromal) et CD146 sont localisées à proximité des vaisseaux sanguins (Spath *et al.*, 2010) et les DPSC positives pour STRO1 expriment CD146, l'actine- $\alpha$  des muscles lisses et l'antigène vasculaire 3G5 associé aux péricytes (Shi et Gronthos, 2003). STRO1 est un marqueur spécifique des CSM (Lin *et al.*, 2011). La protéine CD146 est un marqueur de la lignée des cellules endothéliales, mais elle est surtout considérée comme un marqueur des CSM isolées de l'adulte et son expression peut être liée à la multipotence. De plus, les DPSC affichent un phénotype compatible avec différentes populations de cellules périvasculaires (Shi et Gronthos, 2003).

### 3.4.2. Les cellules souches identifiées dans la dent humaine à partir de dents temporaires exfoliées (SHED)

#### 3.4.2.1. Découverte

Les SHED (*Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*) ont été identifiées pour la première fois en 2003 par Miura comme population de cellules hétérogènes qui représente des cellules souches immatures (Miura *et al.*, 2003). Elles sont facilement accessibles sans préoccupations éthiques. La pulpe peut être facilement disséquée et stockée à long terme dans de l'azote liquide dans des banques de cellules souches, afin d'être utilisée dans le futur pour des transplantations sans risque de réaction immunitaire.

Le taux de prolifération et la multiplication des cellules sont plus élevés par rapport aux DPSC et aux BMSC (Govindasamy *et al.*, 2010).

#### 3.4.2.2. Méthode de culture et d'isolation

La pulpe dentaire est récupérée et placée dans une boîte de culture. Afin d'isoler la fraction des SHED contenues dans la pulpe, le tout est placé dans un milieu de digestion décrit dans le tableau 3 :

**Tableau 3.** Milieu de digestion des SHED.

SHED
3 mg/mL collagénase type I 4 mg/mL dispase
Le tout pendant 1 heure à 37°C, en utilisant la dissociation enzymatique décrite pour la première fois par Miura en 2003.

Après isolation des cellules souches, les cellules uniques (*single-cell suspension*) sont recueillies en passant la masse cellulaire à travers une passoire de 40-70µm.

Puis les cellules sont placées dans des milieux de culture. Les deux milieux fréquemment utilisés sont présentés dans le tableau 4 :

**Tableau 4.** Les deux milieux de culture des SHED les plus fréquemment utilisés.

$\alpha$ -MEM supplémenté avec 20% FCS ( <i>fetal calf serum</i> ) 100 $\mu$ mol/L acide l-ascorbique-2-phosphate 2 mmol/L l-glutamine 100 U/mL pénicilline 100 $\mu$ g/mL streptomycine Le tout en incubation à 37°C dans 5% de CO <sub>2</sub> .	DMEM supplémenté par 10% FBS 100 U/mL pénicilline 100 $\mu$ g/mL streptomycine 0,25 $\mu$ g/mL amphotéricine Le tout à 37°C dans 10% de CO <sub>2</sub> .
---	---

### 3.4.2.3. Caractéristiques

Les SHED ont une morphologie semblable aux cellules souches embryonnaires. Ce sont des cellules d'un aspect fusiforme, adhérentes, de même apparence que les fibroblastes. Elles présentent un fort taux de prolifération. Il est plus élevé que dans les DPSC et les BMSC, ce qui laisse suggérer que les SHED sont une population de cellules souches multipotentes à un stade plus immature.

Les SHED présentent des marqueurs de multipotence tels que CD105, CD90, CD146 et CD44, expriment plusieurs facteurs de croissance (FGF, TGF- $\beta$ , CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*), NGF (*Nerve Growth Factor*), BMP) qui sont impliqués dans la prolifération cellulaire et dans la formation de l'abondante matrice extra-cellulaire. Les SHED n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques, ni les antigènes des lymphocytes ou leucocytes, qui excluent la contamination avec les autres cellules. Les marqueurs des SHED sont influencés par le stress mécanique. Après exposition au stress, des cytokines inflammatoires sont libérées (IL-6, IL-8) (Govitvattana *et al.*, 2013).

Le protéome (l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule) des SHED est similaire aux cellules souches mésenchymateuses dérivées d'autres tissus.

### 3.4.2.4. Potentiel de différenciation : similaire aux autres cellules souches mésenchymateuses

Les SHED, comme les autres cellules souches mésenchymateuses, ont la capacité de se différencier *in vitro* et *in vivo* en ostéoblastes, hépatocytes, adipocytes, chondrocytes, cellules neurales, myocytes, cellules de la peau et odontoblastes (Yildirim, 2012).

#### 3.4.2.4.1. Différenciation en ostéoblastes

Sept jours après isolation des SHED, le milieu de culture est remplacé par le suivant :  $\alpha$ -MEM supplémenté avec 10% FCS, 2 mmol/L de L-glutamine, 0,1 nmol/L de dexamétasone-2-phosphate, 100  $\mu$ mol/L d'acide-L-ascorbique-2-phosphate et 1,8 mmol/L de monopotassium-phosphate. Après deux semaines, le facteur de croissance BMP-4 est utilisé pour induire la différenciation ostéogénique. L'analyse au *Western Blot* montre une régulation à la hausse de l'expression des marqueurs ostéogéniques, angiogéniques, de la BSP et de la DSPP après induction (Miura *et al.*, 2003).

D'autre part, les SHED isolées et exposées à la dexamétasone-sodium-phosphate et au  $\beta$ -glycérophosphate donnent naissance à des structures tri-dimensionnelles. Deux méthodes différentes d'isolation des SHED existent : la dissociation enzymatique et la croissance directe. Dans les deux cas, les structures tri-dimensionnelles apparaissent. Cependant, l'isolation par dissociation enzymatique permet aux SHED d'exprimer un taux de minéralisation plus important et une quantité de matrice minéralisée plus grande que lors de l'isolation par croissance directe (Bakopoulou *et al.*, 2011).

Placées dans le même milieu de culture que les DPSCs pour stimuler la différenciation ostéogénique, les SHED ont montré de meilleures capacités de différenciation (Govindasamy *et al.*, 2010). Une autre étude menée par Takahashi *et al.* (2012) permet d'évaluer la capacité des SHED à se différencier en ostéoblastes en mesurant l'expression des cadhérines (molécules d'adhésion) dans les cellules pulpaire de dents déciduales et permanentes. Après 4 semaines dans un milieu qui induit la différenciation ostéogénique, le niveau des R-cadhérines est exprimé fortement dans les DPSC mais pas dans les SHED, alors que celui des N-cadhérines est comparable dans les deux types de cellules. L'expression des R-cadhérines est liée au statut de différenciation ostéogénique et les cellules qui expriment R-cadhérine n'expriment pas les marqueurs spécifiques des ostéoblastes (ostéotrix et ostéocalcine). Les auteurs en ont conclu que l'expression des R-cadhérines restreint le potentiel de multipotence des cellules pulpaire et que les SHED ont une plus grande capacité que les DPSC à se différencier en ostéoblastes.

La comparaison entre SHED et BMSC cultivées dans un milieu de différenciation ostéogénique montre un potentiel ostéogénique similaire (Vakhrushev *et al.*, 2010). Dans une étude sur la différenciation en tissu minéralisé des SHED en comparaison avec les BMSC, le profil d'expression des gènes a montré que les SHED sont impliquées dans les voies de signalisation des

BMP (Kerkis *et al.*, 2008). En outre, après stimulation de BMP-2, le niveau d'expression des gènes liés à la différenciation ostéogénique augmente dans les deux types de cellules et BMP-4 est exprimé plus fortement dans les SHED que dans les BMSC (résultat confirmé par immunofluorescence).

#### **3.4.2.4.2. Différenciation en adipocytes**

L'adipogenèse est obtenue dans les cultures de SHED en utilisant des mélanges et des dosages différents (isobutyle-méthylxanthine, indométhacine, hydrocortisone, dexaméthasone insuline) (Govindasamy *et al.*, 2010). La différenciation adipogénique est détectée par l'accumulation de gouttelettes lipidiques et par l'augmentation de l'expression de marqueurs adipogéniques tels que PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) et LPL (*LipoProtein Lipase*).

La comparaison entre SHED et DPSC montre une capacité de différenciation adipogénique plus importante pour les SHED (Wang *et al.*, 2012).

#### **3.4.2.4.3. Différenciation en cellules neurales**

Dans des conditions non neuronales, les SHED expriment les marqueurs neuronaux, probablement car la pulpe provient des cellules des crêtes neurales (Miura *et al.*, 2003). La différenciation peut être spontanée ou induite chimiquement avec de l'acide rétinoïque et du DMSO (Kerkis *et al.*, 2006).

Après quatre semaines de culture en présence du supplément B27, du bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) et du EGF, les SHED perdent leur apparence de fibroblastes, prennent une morphologie de cellules neurales et montrent une augmentation de l'expression de  $\beta$ -tubuline, de NeuN (une protéine spécifique des noyaux des neurones) et de GAD (*glutamate décarboxylase*). D'autre part, l'expression des marqueurs des cellules gliales restent inchangés (Miura *et al.*, 2003).

De plus des SHED issues d'un milieu de culture neuronal puis placées dans un mélange de cytokines avec FGF-8, GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*), SHH (*Sonic Hedgehog*) et de la forskoline sont capables de générer une population de cellules contenant des neurones dopaminergiques (Nourbakhsh *et al.*, 2011).

Lors de la différenciation en cellules neuronales, l'expression des marqueurs neuronaux est plus importante pour les DPSC que les SHED (Govindasamy *et al.*, 2010).

#### **3.4.2.4.4. Différenciation en chondrocytes**

La différenciation des SHED en chondroblastes est obtenue en utilisant un mélange avec différents composants et dosages : insuline transferrine sélénium+, acide L-ascorbique-2-phosphate, sodium pyruvate, L-proline, TGF- $\beta$ , dex, HEPES (un composé organique zwitteronique), BMP-6, FBS, pénicilline et streptomycine (Govindasamy *et al.*, 2010).

En présence de BMP-2, les SHED et DPSC se différencient en chondroblastes mais le niveau des marqueurs chondrogéniques est plus élevé dans les SHED que dans les DPSC (Koyama, 2009).

#### **3.4.2.4.5. Différenciation en myocytes**

La différenciation myogénique est obtenue en plaçant les SHED dans un milieu avec : 5% de sérum équin, de l'hydrocortisone, de la dexaméthasone et 2% FBS. A bout de sept jours, des myotubes multinucléés apparaissent, teintés au cristal violet (Lizier *et al.*, 2012). Le facteur de transcription MyoD régule la différenciation des muscles squelettiques. Il est exprimé dans les myoblastes obtenus à partir de la différenciation des SHED. Les SHED sont donc capables de se différencier en myocytes (Lizier *et al.*, 2012).

#### **3.4.2.4.6. Différenciation en cellules endothéliales**

Afin de les différencier en cellules endothéliales, les SHED sont placées *in vitro* dans un milieu de culture contenant rhEGF, de l'hydrocortisone, 5% FBS, rhbFGF, R3-IGF-1, de l'acide ascorbique et 2 ng/mL rhVEGF supplémenté avec 50 ng/mL rhVEGF165. Les SHED se différencient alors en cellules endothéliales FR-2+ et CD31+ (Bento *et al.*, 2013).

#### **3.4.2.4.7. Différenciation en hépatocytes**

Le milieu de culture pour la différenciation des SHED en hépatocytes est décrit pour la première fois par Ishkitiev *et al.* (2010). Les cellules souches sont placées dans 5% de CO<sub>2</sub>, dans du

DMEM supplémenté avec 10% FCS, 100 U/mL pénicilline et 100 ng/mL kanamycine. Pour obtenir la différenciation hépatique, une fois que les cellules ont atteint 70% de confluence, le milieu est supplémenté par 20 ng/mL rhHGF (*recombinant human Hepatocyte Growth Factor*), 2% FCS pendant 5 jours, et avec un mélange de 10 ng/mL oncostatine M, 10 nmol/L de dexaméthasone et 1% d'insuline-transferrine-sélénium-X (ITS) pendant 15 jours de plus. Au bout de 28 jours, les SHED voient leur morphologie changer. Leur aspect de fibroblaste se transforme en cellule parenchymateuse polygonale.

Les cultures de SHED et DPSC dans ce milieu permettent de les différencier en hépatocytes. Les deux types de cellules expriment les marqueurs hépatiques spécifiques, sans différence notable dans leur niveau d'expression.

#### **3.4.2.4.8. Différenciation en cellules pancréatiques**

Govindasamy *et al.* (2010) ont testé le potentiel des SHED à se différencier en cellules pancréatiques ressemblant aux cellules des îlots de Langerhans (ICA – *Islet-like Cell Aggregates*).

La différenciation des SHED en ICA se fait en trois étapes :

- Les SHED indifférenciées sont d'abord placées dans le milieu A contenant : DMEM-KO, 1% BSA, des acides gras libres, 1x-ITS, 4 nM activine A, 1 mM sodium butyrate et 50  $\mu$ M 2-mercaptoéthanol.
- Au bout de trois jours, le milieu A est modifié en milieu B contenant : DMEM-KO, 1% BSA, ITS et 0,3 mM taurine.
- Au jour 5, le milieu B est remplacé par le milieu C : DMEM-KO, 1,5% BSA, ITS, 3 mM taurine, 100 nM glucagon, 1 nM nicotinamide et 1x acides aminés non essentiels.

La différenciation en ICA est confirmée par l'expression du peptide-C (facilite la synthèse de l'insuline), et des facteurs de croissance permettant la régulation de la synthèse d'insuline (Pdx1, Pax4, Pax6, Ngn3 et Igl-1).

En comparaison avec les DPSC, les SHED produisent plus d'ICA, les cellules ayant une taille plus acceptable bien que les différences de taille entre les deux groupes ne soient pas significatives (Kanafi *et al.*, 2013).

#### **3.4.2.4.9. Différenciation en odontoblastes**

Pour obtenir une différenciation en odontoblastes, les SHED sont placées dans le milieu de culture suivant : DMEM supplémenté par 0,5 M vitamine D3, 50 ng/mL d'acide ascorbique-2-phosphate, 10 nM dexaméthasone et 10 mM  $\beta$ -glycérol-phosphate (Mikami *et al.*, 2011). Après trois jours de culture, l'analyse par RT-PCR montre l'expression de gènes spécifiques des odontoblastes, comme DMP1 (*Dentin Matrix Protein*) et la DSPP tandis que la zone de matrice minéralisée est visualisée grâce à la coloration rouge alizarine (Eslaminejad *et al.*, 2010).

Les SHED isolées par dissociation enzymatique produisent plus rapidement le tissu minéralisé mais conservent leur morphologie fusiforme. D'un autre côté, les SHED isolées par croissance directe ont un taux de minéralisation plus faible mais acquièrent le phénotype caractéristique des odontoblastes, avec le prolongement cytoplasmique et la polarisation du corps cellulaire allongé vers la matrice dentinaire produite (Bakopoulou *et al.*, 2011).

Afin d'explorer la possibilité d'une régénération endodontique, l'adhésion des SHED parmi les reconstructions pulpaire a été étudiée *in vitro*. Les reconstructions pulpaire obtenues à partir de supports tri-dimensionnels utilisant des SHED sont insérées dans les canaux radiculaires nettoyés et préparés de dents humaines extraites. L'étude au microscope électronique à balayage montre une adhésion des reconstructions pulpaire aux parois canalaire (Vishwanath *et al.*, 2013).

#### **3.4.3. Autres types de cellules souches**

##### **3.4.3.1. Les cellules souches du desmodonte ou ligament périodontal (PDLSC)**

Les PDLSC (*PerioDontal Ligament Stem Cells*) ont été découvertes en 2004 par Seo *et al.* Ces cellules souches dérivent du ligament parodontal et peuvent se différencier en deux types de cellules : les cémentoblastes et des cellules produisant du collagène de type I.

Le ligament parodontal est le tissu de support de la dent. Il fait le lien entre la dent et l'os alvéolaire. Il alimente en nutriments l'os alvéolaire et le ciment. Il protège la dent en maintenant son homéostasie grâce aux PDLSC. Les maladies parodontales, ou parodontites, sont des maladies inflammatoires chroniques qui induisent la destruction du ligament parodontal ce qui se traduit souvent par la destruction de l'os alvéolaire et finalement par la perte de la dent.

Les thérapies parodontales basées sur les CSM ont démontré la possibilité d'inhiber l'inflammation, de promouvoir la régénération osseuse et de prévenir la perte de la dent. Depuis que les PDLSC ont été isolées et qu'il a été démontré qu'elles étaient capables de générer la structure cément/desmodonte *in vivo*, elles sont considérées comme le traitement de premier choix pour la régénération du ligament parodontal.

Une expérience menée par Akizuki *et al.* (2005) montre les capacités régénératives des PDLSC. Ils ont placé des feuilles de cellules de ligament parodontal au niveau de déhiscences mésiales sur des racines de canines de chiens. Les feuilles de cellules ont permis une amélioration de la cicatrisation du tissu parodontal avec formation d'os, de desmodonte et de cément.

Les PDLSC régulent la réponse inflammatoire en inactivant les lymphocytes T et B (Liu *et al.*, 2013). Elles peuvent stimuler la régénération du parodonte et guérir l'inflammation selon une expérience menée par Ding *et al.* (2010), basée sur un modèle de parodontite chez un miniporc.

Une autre expérience sur un modèle de porc ayant des défauts parodontaux a été menée par Wei *et al.* (2012). Le traitement par vitamine C a permis d'induire l'activité de la télomérase dans les PDLSC, permettant une amélioration significative dans la régénération du tissu parodontal contrairement au groupe de contrôle non traité par vitamine C.

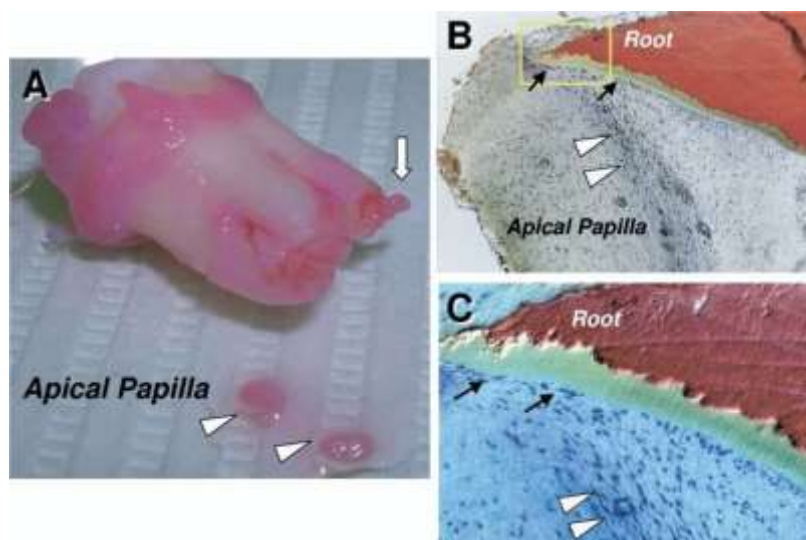
Le desmodonte est semblable aux tendons : ils peuvent tous deux absorber les forces mécaniques dues au stress et à la fatigue. Les PDLSC ont été utilisées pour la régénération de tendons. Des PDLSC d'origine ovine expriment *scleraxis*, un facteur de transcription spécifique des tendons *in vivo* (Gronthos *et al.*, 2006). La même équipe a montré dans une étude récente que les PDLSC humaines encapsulées dans des billes d'alginate, en présence de TGF- $\beta$ 3 pouvaient former un tissu qui s'apparente au tendon après transplantation dans une souris immunodéprimée (Gronthos *et al.*, 2006).

Les PDLSC ont aussi un potentiel de régénération du cartilage. Des billes d'alginate sont utilisées pour encapsuler les PDLSC pour permettre sa régénération. Après 4 semaines d'induction chondrogénique *in vitro*, les PDLSC se différencient en cellules apparentées à des chondrocytes (*chondrocyte-like cells*) (Moshaverinia *et al.*, 2013).

#### **3.4.3.2. Les cellules souches de la papille apicale (SCAP)**

Les SCAP (*Stem Cells from the Apical Papilla*) ont été découvertes en 2006 par Sonoyama *et al.*, par l'existence d'un marqueur spécifique des CSM (STRO-1) dans les cellules de la papille

apicale. Elles sont localisées à l'apex de la dent et bénéficient de la circulation collatérale, ce qui leur permet de survivre pendant la nécrose de la dent. Le tissu de la papille apicale est présent lorsque l'apex de la dent est ouvert. Chez l'adulte, les SCAP sont accessibles en clinique sur les dents de sagesse immatures extraites (**Figure 22**).



**Figure 22.** Photographie de papilles apicales issues d'une dent de sagesse incluse. A : Troisième molaire extraite avec trois racines immatures. Deux papilles apicales ont été détachées de l'apex (têtes de flèches) ; B : Coupe de l'extrémité radiculaire en développement avec la papille apicale attachée, cultivée trois jours *in vitro* avant d'être colorée à l'hémalun/éosine et observée au microscope optique. On y voit des odontoblastes (flèches noires), une zone apicale riche en cellules (têtes de flèches) et le tissu de la papille apicale ; C : Zoom sur la zone encadrée (Huang *et al.*, 2008).

Les SCAP sont la source d'odontoblastes responsable de la formation de la dentine radiculaire. Une fois isolées, les SCAP sont stimulées avec de la Dex supplémentée par de l'acide ascorbique-2-phosphate et du phosphate inorganique et entament alors une différenciation en odontoblastes pour produire de la matrice dentinaire minéralisée. Les SCAP mises en culture expriment les marqueurs spécifiques des odontoblastes tels que la DSPP (Sonoyama *et al.*, 2006). *In vivo*, les SCAP ont été placées dans des supports de HA/TCP puis transplantées dans des souris immunodéprimées. Une structure dentinaire a été générée parmi laquelle une couche de dentine en surface se trouve en continuité avec l'HA/TCP (Sonoyama *et al.*, 2006).

Afin de déterminer ce qui différencie les SCAP des DPSC, les deux types de cellules souches ont été isolés à partir de la même dent. Les résultats montrent que les SCAP ont un nombre de doublement de population ainsi qu'un nombre de cellules STRO1+ plus élevé que les DPSC. De

plus, leur capacité de régénération de tissus est plus grande. Les SCAP expriment la survivine (une protéine anti-apoptotique) à un plus haut niveau que les DPSC et sont positives pour l'activité de la hTERT (*Human Telomerase Reverse Transcriptase*) qui maintient la longueur des télomères, qui est habituellement négative dans les CSM. Ces éléments de preuve suggèrent que les SCAP, issues d'un tissu en développement, représentent une population de progéniteurs précoces, qui sont une excellente source de cellules pour la régénération tissulaire. Ceci met en avant le fait que les tissus en développement contiennent des cellules souches différentes de celles issues des tissus matures.

Les SCAP expriment de nombreux marqueurs dentinogéniques après isolation *ex-vivo*, mais expriment les DSPP, les glycoprotéines de la matrice extra-cellulaire, TGF- $\beta$ , FGFR3, MUC18 à un niveau inférieur à celui des DPSC.

Les SCAP sont positives pour les marqueurs neuronaux tels que tubuline-BIII, acide glutamique décarboxylase, CNPase (*Cyclic-Nucleotide Phosphodiesterase*). Le potentiel neurogénique des SCAP viendrait du fait qu'elles dérivent embryologiquement des cellules des crêtes neurales.

#### Applications cliniques des SCAP :

- La papille apicale joue un rôle dans la **formation de la racine (Figure 23)**. Une expérience sur une molaire de cochon miniature de 9 mois a été réalisée. La papille apicale de la racine distale a été coupée. La pulpe est conservée. La racine distale a stoppé son développement au bout de 3 mois alors que les autres racines ont poursuivi un développement normal (Chueh et Huang, 2006).



**Figure 23.** Photographie d'une molaire immature de cochon miniature ; flèches noires : racine distale dont le développement s'est arrêté, 3 mois après section de la papille apicale ; flèches rouges : les autres racines ont poursuivi leur développement normal (Chueh et Huang, 2006).

- Les SCAP sont impliquées dans le phénomène de « **revascularisation** » décrit par Iwaya *et al.* (2001) et par Banchs et Trope (2004). Il consiste à induire la formation d'un caillot sanguin au sein du canal pulpaire préalablement désinfecté, en impliquant le recrutement de cellules souches en cas de parodontite apicale ou d'abcès sur des dents permanentes immatures (Simon *et al.*, 2013).

En général, une réponse négative à un test de vitalité de la dent avec la présence d'une parodontite apicale est interprétée comme nécrose pulpaire et infection. Dans l'étude d'une dent permanente immature en 2001, Iwaya *et al.* ont rapporté que des zones de pulpe vitale persistaient dans le canal, car le patient percevait l'insertion de la lime endodontique avant d'atteindre l'apex. Trente-six mois après le traitement endodontique, la formation de la racine s'est terminée et la dent a répondu aux tests de vitalité électriques. De même, Chueh et Huang ont rapporté quatre cas de dents permanentes immatures avec lésions péri-radicales où le patient sentait le passage de la lime dans la chambre pulpaire, ou alors une hémorragie pulpaire était observée.

Ceci peut s'expliquer par le fait que l'apex ouvert permet une bonne communication de l'espace pulpaire avec les tissus péri-apicaux. Il est possible pour une maladie péri-apicale de se développer alors que la pulpe est seulement partiellement nécrosée et infectée. Les cellules souches dans le tissu pulpaire et dans la papille apicale survivent probablement à l'infection et permettent la régénération pulpaire et la maturation radiculaire. L'infection a pu se diffuser à travers la pulpe survivante, atteignant le péri-apex. Une autre possibilité est que la résorption osseuse est la conséquence de la libération de cytokines pro-inflammatoires depuis la pulpe enflammée vers le péri-apex. Cependant, cette situation semble peu probable pour causer la formation de fistules qui indiquent la présence d'un abcès avec une infection sévère. Une infection prolongée pourrait mener vers une nécrose totale de la pulpe et de la papille apicale ; à ce moment, l'édification radiculaire deviendrait impossible.

En cas de nécrose pulpaire suite à un traumatisme sur dent permanente immature, la technique de revascularisation implique le recrutement des SCAP et permet le maintien du développement radiculaire et la régénération des tissus. Le protocole est le suivant (Cehreli *et al.*, 2012) :

- irrigation du canal radiculaire avec de l'hypochlorite de sodium,

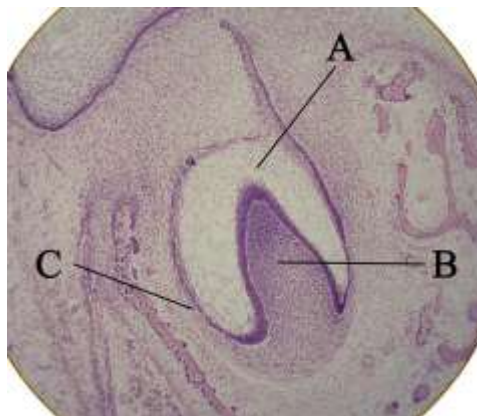
- mise en place d'hydroxyde de calcium en pâte épaisse ou d'un cocktail d'antibiotiques (mélange de ciproflaxine, de métronidazole et de minocycline) à l'intérieur du canal afin de le désinfecter,
- scellement de la cavité d'accès avec un pansement type Cavit<sup>®</sup>,
- après trois à quatre semaines, la pâte intracanaulaire est retirée,
- une lime manuelle de type K est passée au-delà de l'apex pour induire un caillot sanguin dans le canal,
- mise en place d'une éponge de collagène sur le caillot formé,
- mise en place d'un matériau étanche et bioactif au-dessus de l'éponge,
- obturation de la cavité par un composite collé.

En France, la mise en place d'un cocktail d'antibiotiques n'est pas autorisée. L'utilisation d'hydroxyde de calcium reste la technique principale mais les résultats sont moins bons.

La présence des SCAP dans le caillot sanguin a été démontrée par Lovelace *et al.* (2011). Le caillot sert de guide à la recolonisation cellulaire. L'objectif est de régénérer un tissu pulpaire capable de permettre la poursuite de l'édification radiculaire.

#### 3.4.3.3. Les cellules souches issues du follicule dentaire (DFPC)

Le follicule dentaire est un tissu conjonctif d'origine ecto-mésenchymateuse qui se forme autour de l'organe de l'émail et de la papille dentaire et qui l'entoure complètement (**Figure 24**).



**Figure 24.** Coupe d'un bourgeon dentaire ; A : organe de l'émail ; B : papille dentaire ; C : follicule dentaire (Dozenist, 2005).

Il contient les précurseurs de cellules qui vont former le parodonte, c'est-à-dire qu'il évoluera en ligament parodontal, en os alvéolaire et en ciment. Ses cellules progénitrices découvertes en 2005 par Morsczeck *et al.* sont appelées DFPC (*Dental Follicul Precursor Cells*). Les DFPC sont capables de se différencier en ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes et cémentoblastes selon le milieu de culture approprié (Yao *et al.*, 2008). Les DFPC expriment des marqueurs cémentoblastiques alors que les DPSC expriment des marqueurs odontoblastiques. Les DPSC semblent avoir un potentiel de formation des tissus durs plus élevé que les DFPC, mais les tissus durs comme la dentine n'ont pas été identifiés après transplantation de ces cellules chez des souris immunodéprimées (Yao *et al.*, 2008). Après transplantation *in vivo*, les DFPC sont capables de recréer un nouveau ligament parodontal (Volponi *et al.*, 2010).

#### **4. Ingénierie tissulaire et applications des DPSC *in vivo***

##### **4.1. Introduction**

Les débuts de l'ingénierie tissulaire se font dans les années 1980 avec le chimiste Robert Langer et les frères Joseph et Charles Vacanti. Selon eux, il est possible de régénérer un tissu en cultivant des cellules spécifiques sur un matériau biodégradable.

La toute première opération a été publiée en 1991 avec Cima, Langer et Vacanti. Elle démontrait la possibilité de régénérer un tissu cartilagineux en forme d'oreille humaine dans le dos d'une souris (Simon *et al.*, 2012). Grâce à des biopolymères, Cima fabrique un moule parfait de pavillon d'oreille humaine (Cima *et al.*, 1991). Dans ce moule, Charles Vacanti introduit une sorte de polyester poreux qu'ilensemence avec les chondrocytes vivants de veau. La structure est ensuite implantée en sous-cutané, sur le dos d'une souris nue (Vacanti *et al.*, 1992). Les jeunes chondrocytes se développent et épousent la forme du moule avec, comme résultat, l'une des images les plus mal comprises dans l'histoire de la biologie: une souris nue dotée d'une oreille humaine... sur le dos. Depuis, les exemples de stratégies médicales visant à restaurer, maintenir ou améliorer la fonction d'un tissu ou d'un organe ne cessent de croître. La connaissance parfaite du développement initial du tissu durant l'embryogenèse est indispensable pour créer de nouvelles thérapeutiques.

#### 4.2. Les banques de cellules souches (DPSC et SHED)

Congeler et stocker des cellules souches pulpaire, comme il est déjà possible de faire avec les cellules issues du sang de cordon ombilical, des muscles et des nerfs, est le rêve de tous ceux qui ont foi dans les promesses des cellules souches.

Le principal obstacle est de se procurer ces cellules. Il ne s'agit pas de les prélever sur des dents vivantes car l'opération les mutilerait. La mise en place de banques de stockage de ces cellules souches reste la meilleure solution. Seraient utilisées : des dents de lait riches en cellules souches et des dents de sagesse incluses extraites. Ces dernières peuvent être conservées jusqu'à ce que le patient en ait besoin.

Cependant, tout ceci inquiète la communauté scientifique car il y a un risque de commercialisation.

La première biobanque dentaire est née au Texas (États-Unis) avec la société BioEden. Depuis, d'autres ont suivi, comme la société StemSave qui, dans le Colorado, rétribue même les dentistes (90 dollars) qui acceptent de récupérer les dents de leurs patients après s'être engagé à faire partie des fournisseurs de StemSave. Le concept a également fait récemment son apparition au Royaume-Uni et en Suisse avec Future Health Biobank, autorisant le stockage privé et payant : il faut compter 1995 euros pour un stockage pendant 25 ans des cellules souches dentaires, et 3100 euros pour des cellules souches du sang et du tissu de cordon.

L'Institut Clinident BioPharma Swiss propose un service de préparation et de conservation des cellules souches de la pulpe dentaire. L'Institut Clinident est une société française spécialisée en biologie cellulaire et moléculaire appliquée à la médecine orale depuis 2003. Grâce au développement des technologies sur les cellules souches, son antenne Institut Clinident Biopharma Swiss est aujourd'hui capable de proposer un service de conservation des cellules souches de la pulpe dentaire. Cet institut, installé à Bâle, est une biobanque en charge de la préparation et de la cryopréservation des cellules souches pluripotentes de la pulpe dentaire. Cette biobanque est accréditée par Swiss Medic (l'agence de produits thérapeutiques Suisse) et est certifiée GMP (*Good Manufacturing Practices* = Bonnes Pratiques de Fabrication).

Après extraction de la dent par le chirurgien dentiste, elle est placée dans un kit de collecte et de transport UN3373 fourni par l'Institut Clinident BioPharma Swiss. Lors du déroulement de la prestation, l'Institut Clinident BioPharma Swiss assure :

- une information claire et globale et un support opérationnel,
- la signature d'un contrat pour le traitement et le stockage des dents,
- l'expédition du kit de collecte,
- le transport suivi vers le laboratoire de préparation,
- le traitement de l'échantillon dans des conditions réglementées, validées et contrôlées,
- le contrôle qualité de l'échantillon,
- la cryoconservation pendant 20 ans en Allemagne chez BioKryo,
- l'envoi d'un certificat de conservation.

Après la signature du contrat, le kit de collecte est expédié au cabinet du praticien ou au domicile du patient. A l'intérieur, les instructions de stockage du kit avant utilisation sont détaillées. Sa prise en charge vers le laboratoire de préparation, une fois la dent prélevée, est organisée par l'Institut Clinident BioPharma Swiss dans les plus brefs délais.

La dent est traitée dans le laboratoire de préparation selon un protocole validé et une procédure qualité stricte permettant de préserver l'intégrité des cellules souches de la pulpe dentaire. Les tubes de conservation, identifiés par un numéro à code-barres unique, propre à l'échantillon, sont amenés à une température finale inférieure à -130°C (azote liquide en phase gazeuse) garantissant des conditions de stockage et de sécurité maximales pendant 20 ans (et plus si reconduction du contrat).

La voie semblait donc toute tracée pour que la France se dote à son tour d'une telle structure. En juin 2011, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) avait même donné son feu vert à l'institut Clinident BioPharma Swiss, avant de revenir sur sa décision à l'automne, estimant que les travaux étaient trop préliminaires et contraires au principe de non-patrimonialité du corps humain reposant sur l'anonymat et la gratuité. Une exception française qui a enclenché une bataille judiciaire, toujours en cours.

#### Les banques de SHED :

Les SHED sont complémentaires aux cellules souches contenues dans le sang de cordon, mais le coût de stockage est moindre.

Protocole :

- 1ère étape : récupération des dents temporaires exfoliées avec pulpe vitale, sans lésion péri-apicale ni kyste.
- 2ème étape : elles sont placées dans un récipient contenant une solution saline tamponnée au phosphate hypotonique pour prévenir du dessèchement.
- 3ème étape : le récipient est placé dans un second récipient en métal et doit parvenir à la banque de cellules souches dans les 40 heures qui suivent l'extraction.
- 4ème étape : lorsque la dent arrive dans la banque, les cellules souches sont isolées et mises en culture en accord avec le protocole décrit précédemment.
- 5ème étape : pour la cryoconservation, les cellules sont mises en suspension dans un milieu contenant 20% FBS, 70% DMEM et 10% diméthylsulfoxyde (DMSO) avec  $5.10^5$  cellules/mL et la température est diminuée d'un degré Celsius chaque minute jusqu'à  $-70^{\circ}\text{C}$  (Saha *et al.*, 2011). Sous l'effet du froid, l'eau contenue dans le cytoplasme des cellules gèle et risque de les faire éclater. Le DMSO est un cryoprotecteur. Il permet au réseau d'eau de cristalliser différemment, ce qui est moins délétère pour la cellules.
- 6ème étape : les cellules sont transférées dans de l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Les cellules peuvent être cryoconservées pour une longue période et si besoin, peuvent être décongelée dans un bain à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 2 minutes, rincées deux fois avec du 20% FBS et du 70% DMEM et placées en culture (Kerkis *et al.*, 2006).

La pulpe extraite de dents temporaires exfoliées peut aussi être conservée en bloc. Elle est mélangée à un milieu pour la cryoconservation (10% DMSO et 90% FBS à  $4^{\circ}\text{C}$ ), gardée la nuit à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis transférée dans de l'azote liquide et conservée pendant 25 à 30 mois.

Pour simplifier le protocole de conservation initial, une nouvelle méthode permettant de conserver les SHED au sein de la dent sans la fracturer est proposée (Gioventu *et al.*, 2012). La dent est percée au niveau de la jonction couronne-racine avec un laser Nd/YAG pour faire des micro-tunnels pour permettre à la solution de cryoconservation d'atteindre la pulpe. Puis la dent est placée dans un milieu avec du DMSO à  $-80^{\circ}\text{C}$  (Yamaza *et al.*, 2010). L'analyse *in vitro* montre que la morphologie, le phénotype immun, les taux de viabilité et de prolifération des SHED sont similaires pour les dents préservées par perçage laser que celles extraites. A l'inverse, les SHED extraites de dents cryoconservées sans perçage laser montrent une perte significative des taux de viabilité et de prolifération (Gioventu *et al.*, 2012).

### 4.3. Applications des cellules souches pulpaire *in vivo*

#### 4.3.1. Introduction

Lors d'utilisation de cellules souches, les trois principaux risques sont le rejet immunologique du greffon, le développement d'un cancer et la transmission d'agents infectieux. Comme pour les greffes, le système immunitaire du receveur ne peut pas accepter les cellules souches provenant du donneur. La meilleure méthode est donc d'utiliser les propres cellules souches du patient. C'est ainsi que la découverte des iPSC a suscité l'espoir de traiter un patient tout en évitant le risque de rejet immunitaire. Utiliser des cellules propres au patient serait une solution au problème d'immunocompatibilité. Les applications *in vivo* des cellules souches pulpaire portent toutes à ce jour sur des modèles animaux immunodéprimés afin d'éviter les rejets. De plus, un cancer peut se former si la multiplication des cellules n'est pas minutieusement contrôlée. Les cellules souches sont proches des cellules cancéreuses. Les techniques actuelles concernant les iPSC font appel à des modifications génétiques des cellules qui peuvent conduire à la formation de tumeurs.

Le rat est le mammifère le plus fréquemment utilisé en expérimentation animale. Environ 90% des gènes du rat sont partagés avec l'homme (Gibbs et al., 2004). Tous les gènes humains connus pour être associés à des maladies ont des équivalents dans le génome du rat (Gibbs et al., 2004). De plus, les réactions inflammatoires chez l'humain et le rat sont proches.

Il existe deux types de régénération pulpaire :

- La régénération partielle se base sur le fait qu'au début de l'inflammation pulpaire, seule une partie du tissu est infectée. L'inflammation est compartimentée avant de se diffuser à l'ensemble du tissu pulpaire (Huang, 2009). Le principe est que la pulpe saine préservée sert à régénérer le tissu éliminé par l'inflammation (Huang, 2009). Après pulpotomie, un dispositif médical inductif ou une pulpe artificielle composée de DPSC est implanté(e) dans la dent. Ces matrices implantées sont constituées de collagènes de type Iensemencé de DPSC. La vascularisation assurée par le foramen apical et existant déjà dans le parenchyme pulpaire préservé sain permet la survie des matrices. Le but est de créer un tissu conjonctif fonctionnel, vascularisé et innervé.

- La régénération totale de la pulpe pourrait sembler simple étant donné le faible volume de tissu à régénérer (environ 10-100µL) par rapport à un organe ou un tissu. Cependant plusieurs problèmes se posent : la situation du tissu dans une cavité dont la vascularisation est compliquée l'étroitesse du foramen apical et la composition de ce tissu par différentes cellules souches et différentes couches.

#### **4.3.2. Régénération *in vivo* d'un tissu qui s'apparente au complexe dentino-pulpaire : étude de Prescott *et al.* (2008)**

##### **4.3.2.1. Matériel et méthode**

La présence d'une perforation compromet le résultat d'un traitement endodontique. Une des utilités de la thérapie régénérative endodontique est de réparer les perforations des canaux radiculaires. En plus des nutriments et des interactions systémiques *in situ*, les trois composants essentiels pour la régénération tissulaire sont : les cellules souches, un support et les facteurs de croissance. Cette étude enquête sur le rôle de chaque composant de la triade de régénération tissulaire dans l'organisation et la différenciation des DPSC. Les chercheurs ont utilisé un modèle de perforation au niveau de la furcation de dents de sagesse humaines replacées dans un modèle murin. Le collagène sert de support et le facteur de croissance est le DMP1. Le MTA (*Mineral Trioxide Aggregate*) est le matériau de contrôle.

L'expérience utilise vingt dents de sagesse humaines extraites. La pulpe camérale est retirée. La couronne et la racine sont sectionnées avec un disque de façon à ne conserver qu'une tranche de dentine qui correspond au plancher de la chambre pulpaire. Une perforation d'1mm de diamètre est faite avec une fraise à travers l'épaisseur de dentine. Les tranches de dentine sont ensuite passées à l'autoclave.

Les vingt tranches de dentine sont réparties en cinq groupes de quatre de façon aléatoire, selon le matériau utilisé pour combler la perforation.

- Groupe 1 : seul du MTA gris est placé dans la perforation de manière à l'obturer complètement.
- Groupe 2 : un support de collagène de type I et de poudre de céramique, humidifié avec du PBS est placé dans la perforation.

- Groupe 3 : un support de collagène imprégné avec le DMP1 lyophilisé à concentration de 1,2mg/mL est placé dans la perforation.
- Groupe 4 : un support de collagène imprégné avec le DMP1 et une pastille de  $5.10^6$  de DPSC humaines cultivées auparavant.
- Groupe 5 : un support de collagène avec une pastille contenant  $5.10^6$  DPSC est placé dans la perforation.

Chaque échantillon est implanté en sous-cutané dans le dos de souris immunodéprimées (**Figure 25**). A six semaines, les animaux sont sacrifiés et les sites de perforation sont analysés au microscope optique et par coloration histochimique.



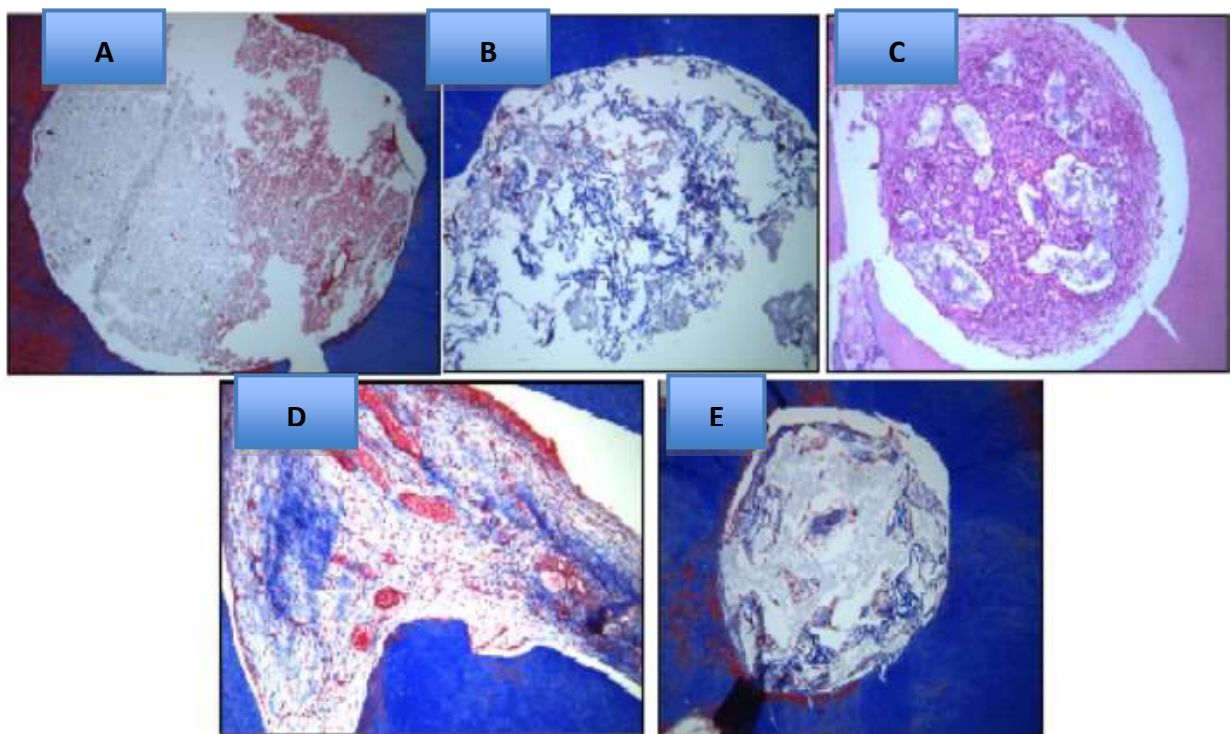
**Figure 25.** Souris immunodéprimée avec l'implant sous-cutané dans la partie dorsale (Prescott *et al.*, 2008).

#### 4.3.2.2. Résultats

- Groupe 1 : le MTA apparaît gris, sa couleur d'origine. Quelques globules rouges sont visibles en périphérie du site de perforation (**Figure 26**).
- Groupe 2 : le trichrome de Masson colore le support de collagène en bleu. Le support est en train de se dégrader et des tissus de remplacement ne sont pas présents. Des globules rouges et des cellules nucléées sont dispersées (**Figure 26**).
- Groupe 3 : dans ce groupe, de nombreuses cellules viables sont présentes. La matrice de collagène est formée en périphérie mais il n'y a pas d'apposition au centre du site de perforation. Le support de collagène a commencé à se dégrader et quelques cellules ont rempli partiellement

les vides. Une coupe améliorée des vides montre la présence de débris et le manque d'organisation cellulaire (**Figure 26**).

- Groupe 4 : ce groupe montre plusieurs signes de régénération tissulaire. Alors que le support de collagène commence à se dégrader, des cellules présumées fibroblastes de par leur morphologie et des cellules endothéliales débutent l'apposition d'une matrice. Des vaisseaux sanguins et une matrice de collagène sont visibles dans le tissu du site de perforation. Des zones autour du site de perforation montrent une prolifération cellulaire indiquant la progression de la régénération tissulaire dans ces secteurs (**Figure 26**).
- Groupe 5 : les résultats sont semblables au groupe 2 (support de collagène seul). Quelques globules rouges sont visibles, quelques cellules nucléées et les restes de l'effondrement du support de collagène. Aucune matrice ne s'est formée ni aucun infiltrat cellulaire (**Figure 26**).



**Figure 26.** Coupes observées au microscope optique. **A** : groupe 1, MTA uniquement (10x10) ; **B** : groupe 2, support de collagène uniquement (10x20) ; **C** : groupe 3, support de collagène et DMP1 (10x10) ; **D** : groupe 4, support de collagène en présence de DMP1 et DPSC, présence de vaisseaux sanguins et début de régénération tissulaire (10x10) ; **E** : groupe 5, support de collagène et DPSC uniquement (10x40) (coloration à l'hémalun-éosine) (Prescott *et al.*, 2008).

#### 4.3.2.3. Discussion

D'autres facteurs de croissance comme les BMP peuvent induire la différenciation des DPSC (Hao *et al.*, 2004), mais le DMP1 a été utilisé pour cette expérience car il peut induire la différenciation des cellules souches en odontoblastes et stimuler la formation de tissus minéralisés (Narayanan *et al.*, 2001). De plus, l'apposition de minéraux est dix fois meilleures en présence de DMP1 (He *et al.*, 2003).

Le MTA est un excellent matériau de réparation des perforations. Cependant, il ne se dégrade pas et ne permet pas au tissu naturel de se développer pour le remplacer. En fait, la capacité du MTA à résister à sa dégradation *in vivo* est considérée comme un de ses avantages. D'un autre côté, le support de collagène se dégrade naturellement pour permettre la régénération tissulaire. Le support utilisé est volontairement fait de collagène car sa manipulation est très simple. De plus, il possède de nombreuses similarités avec le collagène le plus retrouvé dans la pulpe saine de dents humaines, le collagène de type I.

Des souris immunodéprimées sont nécessaires pour éliminer le risque de rejet immunitaire envers les DPSC. Récolter et utiliser des cellules autologues est une solution au problème d'immunocompatibilité.

Dans le groupe 1, le MTA est le seul matériau visible parmi tous les échantillons. Aucune cellule, ni matrice de collagène, ni vaisseaux ne sont présents. La formation de tissu calcifié n'était pas attendue car l'expérience n'a duré que six semaines. La formation de tissu dur autour du MTA a été rapportée après de plus longues périodes (Yaltirik *et al.*, 2004). Dans le groupe 2, il n'y avait que le support dégradé en partie, aucune présence de tissu calcifié.

Dans les groupes 3 et 5, il manquait à chaque fois un des composants de la triade de régénération tissulaire (les DPSC et le DMP1 respectivement). Bien que les deux groupes aient montré des étapes initiales d'organisation tissulaire, ils n'avaient pas une organisation assez importante pour permettre la croissance des tissus. Cependant dans le groupe 3, il y a une infiltration de cellules nucléées. Leur identité et origine sont inconnues. Ces cellules sont supposées être des fibroblastes de par leur morphologie. Le groupe 3 possède un plus grand nombre de cellules nucléées que les autres groupes excepté le groupe 4.

Dans le groupe 4, les trois composants de la triade de régénération tissulaire sont présents (DPSC, support de collagène et DMP1). Ce groupe montre une organisation tissulaire précise. La

coloration au trichrome de Masson démontre la néo-formation d'une matrice de collagène. Des parties de l'échafaudage sont visibles mais l'essentiel a été dégradé et les fibroblastes produisant du collagène ont pris sa place. Il n'y a pas de formation de tissu dur ce qui est normal à six semaines. Il est intéressant de noter que des vaisseaux sanguins se sont formés au niveau du site de perforation. Or, l'angiogenèse est le précurseur de la réparation tissulaire. Elle permet aux nutriments et aux facteurs de croissance d'atteindre le site endommagé. Une étude de Roberts-Clark et Smith a conclu que la matrice dentinaire contient des facteurs de croissance angiogéniques et que leur libération depuis la matrice après une blessure pouvait contribuer à la réponse de réparation du complexe dentino-pulpaire (Roberts-Clark et Smith, 2000).

Pour conclure, le groupe 4 montre le stade initial de régénération tissulaire. En l'absence de DMP1, il n'est pas possible de démontrer une organisation tissulaire ou une différenciation cellulaire. Ainsi, DMP1 induit la différenciation des cellules pulpaires indifférenciées en cellules synthétisant de la matrice.

Cette étude confirme l'utilité de la triade DPSC-support-DMP1 pour explorer les mécanismes de régénération tissulaire avec pour but ultime la formation de tissu dur au niveau du site de perforation.

#### **4.3.3. Régénération dentinaire après exposition pulpaire sur un modèle de rat : étude de JB Souron, 2013**

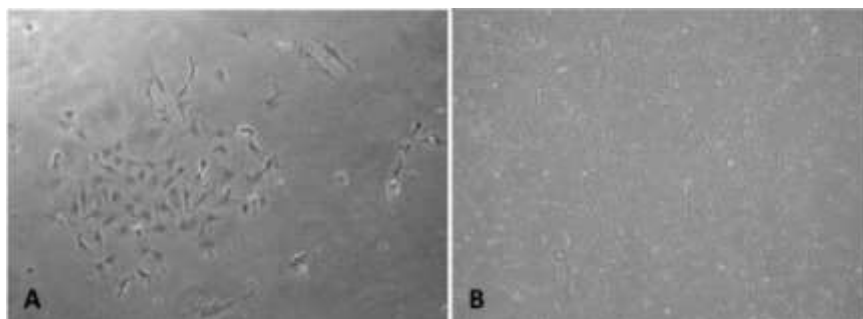
Il s'agit d'une expérience de régénération partielle de la pulpe. Dans un premier temps, il faut fabriquer la pulpe artificielle. Dans un deuxième temps, il faut l'implanter dans la dent *in vivo*.

##### **4.3.3.1. Matériel et méthode**

###### **4.3.3.1.1. Fabriquer la pulpe artificielle**

La pulpe de dents de sagesse humaine extraites chez des patients âgés de 18 à 30 ans est isolée en blocs de 1 à 2mm de large. Elle est cultivée selon le protocole de Gronthos *et al.* (Gronthos *et al.*, 2000). De la même manière, la pulpe de dents de rats âgés de 5 jours est prélevée et mise en culture selon le même protocole. Les milieux de culture sont renouvelés deux fois par semaine (**Figure 27**). Dans cette étude, les cellules pulpaires ne sont pas triées au préalable ; la

population pulpaire hétérogène est utilisée dans sa totalité. En effet, le but n'est pas d'implanter dans la dent uniquement des cellules souches car cela mènerait à la minéralisation de la chambre pulpaire.



**Figure 27.** Cellules pulpaire de rat en culture (A) et cellules pulpaire humaine (B) (Souron, 2013).

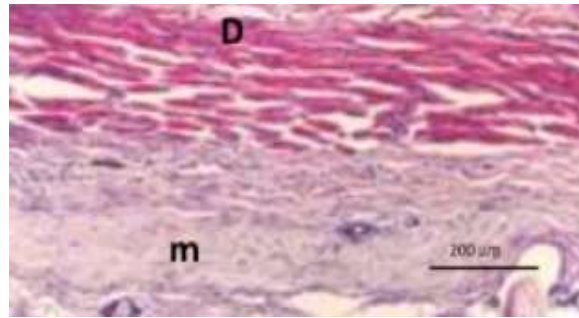
Par la suite, des matrices supports des cellules pulpaire sont créées. Du collagène de type I est prélevé sur des tendons de queue de rat et polymérisé selon le protocole de Bell *et al.* (1979). Le collagène va pouvoir imiter le micro-environnement pulpaire. Les cellules cultivées sont ajoutées au collagène de type I jusqu'à obtenir une concentration de 2 millions de cellules par millilitre. Une matrice est un mélange de DMEM, de bicarbonate de soude et de DMEM sans sérum contenant les cellules pulpaire ( $8.10^5$  cellules par matrice). Les matrices représentent les « pulpes artificielles » qui seront placées dans un incubateur de 4 à 24 heures avant leur implantation.

Les DPSC contenues dans les matrices sont marquées radioactivement à l'oxyne-indium 111, ce qui permet de les localiser grâce aux méthodes de scintigraphie. Ce marqueur n'est pas cytotoxique. Il n'affecte pas la prolifération ni la survie des cellules marquées (Aicher *et al.*, 2003).

Le groupe de contrôle est constitué par des cellules marquées puis lysées avant le mélange avec le collagène.

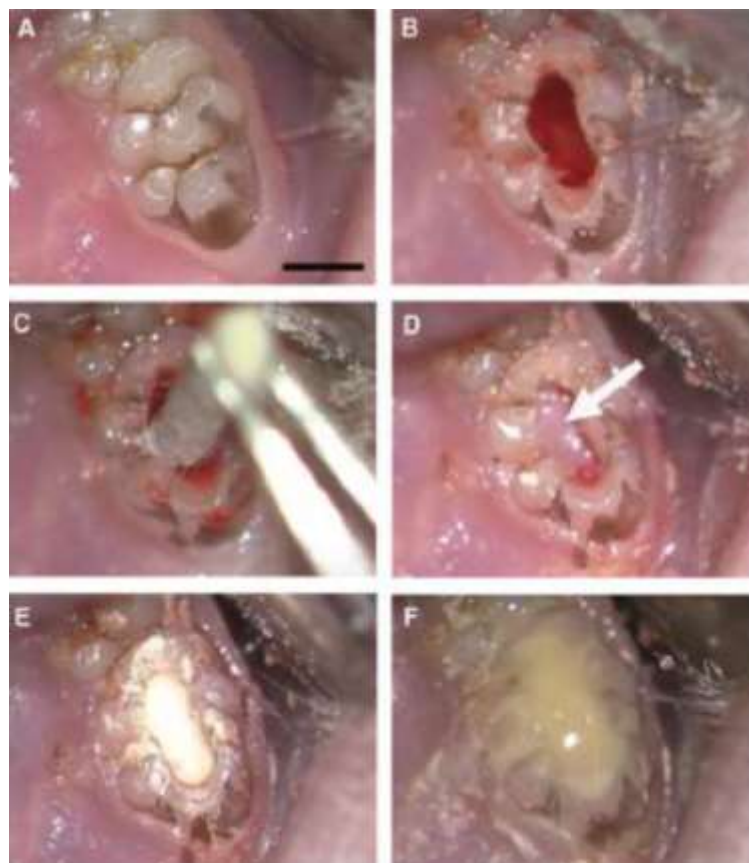
#### **4.3.3.1.2. Implantation des pulpes artificielles**

Dans un premier temps, des matrices sont implantées de manière ectopique dans le dos de 6 rats immunodéprimés anesthésiés (**Figure 28**). D'un côté du dos, des matrices avec cellules sont implantées et de l'autre côté des matrices sans cellules. Puis 3 rats sont sacrifiés au bout de 15 jours et les 3 autres au bout de 30 jours.



**Figure 28.** Coupe d'une matrice cellularisée implantée en sous-cutané chez le rat immunodéprimé, coloration à l'hémalun-éosine. La matrice est bien intégrée aux tissus environnants car difficile à localiser et sans inflammation ; m : matrice implantée ; D : derme (Souron, 2013).

Dans un second temps, les matrices sont implantées dans des dents de rat anesthésiés ayant subi une effraction pulpaire (**Figure 29**).



**Figure 29.** Observation au microscope optique de l'implantation des matrices dans la première molaire de rat ; A : première molaire de rat ; B : pulpotomie ; C : mise en place de la matrice dans la chambre pulpaire après hémostase ; D : matrice implantée ; E : mise en place du ciment biocompatible : silicate de calcium ; F : mise en place du composite (Souron, 2013).

Au total, 10 rats supplémentaires sont utilisés : 5 avec implantation de matrices avec cellules lysées et 5 avec matrices contenant les cellules entières. La dent choisie est la première molaire maxillaire avec pulpotomie. Après hémostase, les matrices sont implantées dans la chambre pulpaire. Le tout est étanchéifié avec un ciment biocompatible tel que la Biodentine® (Septodont™) puis recouvert d'une couche de composite photopolymérisable pour résister à l'abrasion.

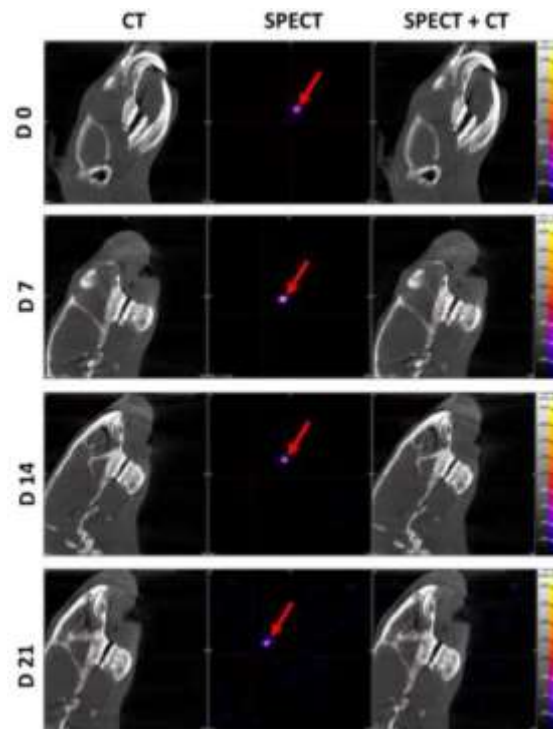
Au bout d'un mois, les rats sont sacrifiés. Les maxillaires sont récupérés et déshydratés avant inclusion dans la paraffine. Des coupes longitudinales de 7µm d'épaisseur sont réalisées, puis déparaffinées et réhydratées avant coloration.

Les cellules marquées sont observées par scintigraphie grâce au système nanoSPECT/CT© de Bioscan™. La coloration à l'hémalum-éosine va permettre d'observer les tissus dentaires et périodontaires. La coloration au trichrome de Masson permet l'étude des tissus du dos du rat. La technique d'immunohistochimie est employée pour détecter la formation de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses. L'immunohistochimie permet de localiser la présence d'un anticorps qui se lie spécifiquement à l'antigène recherché. L'anticorps anti-facteur de Willebrand et l'anticorps anti-CGRP sont mis en place dans les cultures de cellules.

#### **4.3.3.2. Résultats**

##### **4.3.3.2.1. Suivi des cellules marquées radioactivement**

L'analyse des cellules marquées se fait au SPECT+CT (**Figure 30**). SPECT (*single photo emission computed tomography*) désigne la tomographie par émission monophotonique. Cette technique d'imagerie médicale permet de réaliser des images et des reconstructions en trois dimensions grâce à un ensemble de gamma caméras qui tournent autour de la zone étudiée. CT (*computed tomography*) désigne la tomodensitométrie, aussi appelée scanographie. On parle de SPECT+CT lorsque les deux types de scanners sont utilisés et que les deux images sont fusionnées. Le scanner obtenu donne des informations plus précises sur la zone étudiée.



**Figure 30.** Analyse au SPECT+CT d'une matrice cellularisée implantée dans la première molaire de rat à J0, J7, J14 et J21 : la matrice est restée en place car le même signal est retrouvé (flèche rouge) (Souron, 2013).

Les cellules sont restées implantées dans la chambre pulpaire car l'ensemble du corps a été scanné avec le SPECT/CT et aucun autre signal n'a été détecté. Durant les 3 semaines de visualisation, aucun signal radioactif n'a été visualisé dans le corps à part dans les premières molaires des rats. Il n'est pas possible de les visualiser plus longtemps car le signal radioactif diminue au cours du temps. A l'avenir, les techniques de visualisation par IRM seraient plus appropriées.

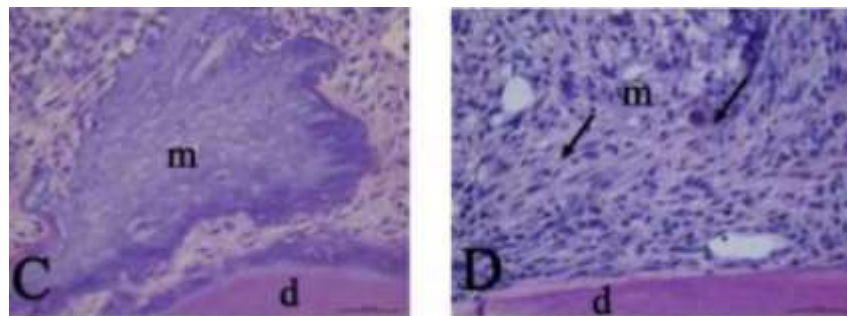
L'intensité du signal est liée à l'intégrité des cellules. Il est 5 fois plus fort chez les cellules entières que chez les cellules lysées.

#### 4.3.3.2.2. Analyse histologique

Cette analyse des tissus est réalisée après le sacrifice des rats, un mois après le début de l'expérience et va permettre de connaître la composition et la fonctionnalité du tissu formé.

La coloration à l'hémalun-éosine met en évidence des cellules dans les matrices pourvues de cellules entières alors que les matrices qui avaient reçu les cellules lysées sont dépourvues de

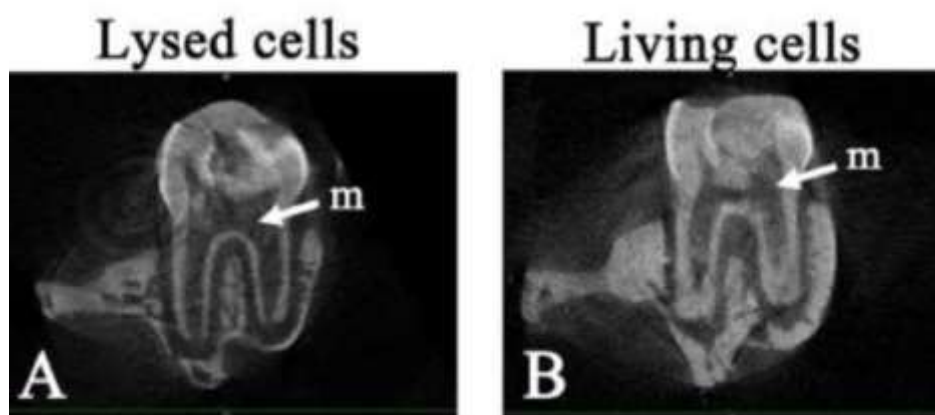
cellules. Dans les matrices contenant les cellules vivantes, des fibroblastes sont retrouvés (**Figure 31**).



**Figure 31.** Coupes des matrices au bout d'un mois (m : matrice ; d : dentine ; flèches : fibroblastes), coloration à l'hémalun-éosine ; **C** : matrice ayant reçu des cellules lysées qui est dépourvue de cellules ; **D** : matrice pourvue de cellules où des fibroblastes sont visibles (Souron, 2013).

La technique d'immunohistochimie permet de mettre en évidence des éléments vasculaires grâce à l'anticorps anti-facteur de Willebrand. Les vaisseaux sont situés à côté des matrices ayant reçu les cellules entières. Grâce à l'anticorps anti-CGRP (le *Calcitonin Gene Related Peptide* est un neuropeptide), des éléments nerveux sont visibles. De plus, des cellules marquées immunologiquement par le PCNA (agent de prolifération nucléaire) sont retrouvées, ce qui indique une activité mitotique des cellules fibroblastiques retrouvées.

L'analyse au micro-scanner permet de mettre en évidence une apposition de dentine dans la molaire qui a reçu la matrice portant les cellules entières, ce qui n'avait pas été observé histologiquement (**Figure 32**), ainsi qu'une fermeture apicale des racines.



**Figure 32.** Visualisation de la molaire de rat par technique de micro-scanner au bout d'un mois ; m : emplacement des matrices ; **A** : matrice avec cellules lysées ; **B** : matrice avec cellules vivantes : apposition dentinaire et fermeture apicale (Souron, 2013).

#### **4.3.3.3. Limites de l'expérience**

Cette expérience montre que la « pulpe artificielle » est capable de régénérer la pulpe. Cependant, d'un point de vue clinique, les pulpes artificielles devraient être intégrées dans des pulpes inflammatoires et non saines comme décrit précédemment. Le but de ces recherches étant de les intégrer à la clinique humaine en cas de carie ou de traumatisme avec effraction pulpaire afin de régénérer le tissu pulpaire et la matrice dentinaire.

De plus, l'animal utilisé est le rat, ce qui pose des problèmes d'échelle et anatomique. Afin d'évoluer vers la clinique humaine, des expériences sur des mini-porcs sont souhaitables car ces derniers présentent deux dentures comme chez l'homme et une physiopathologie comparable à celle de l'homme.

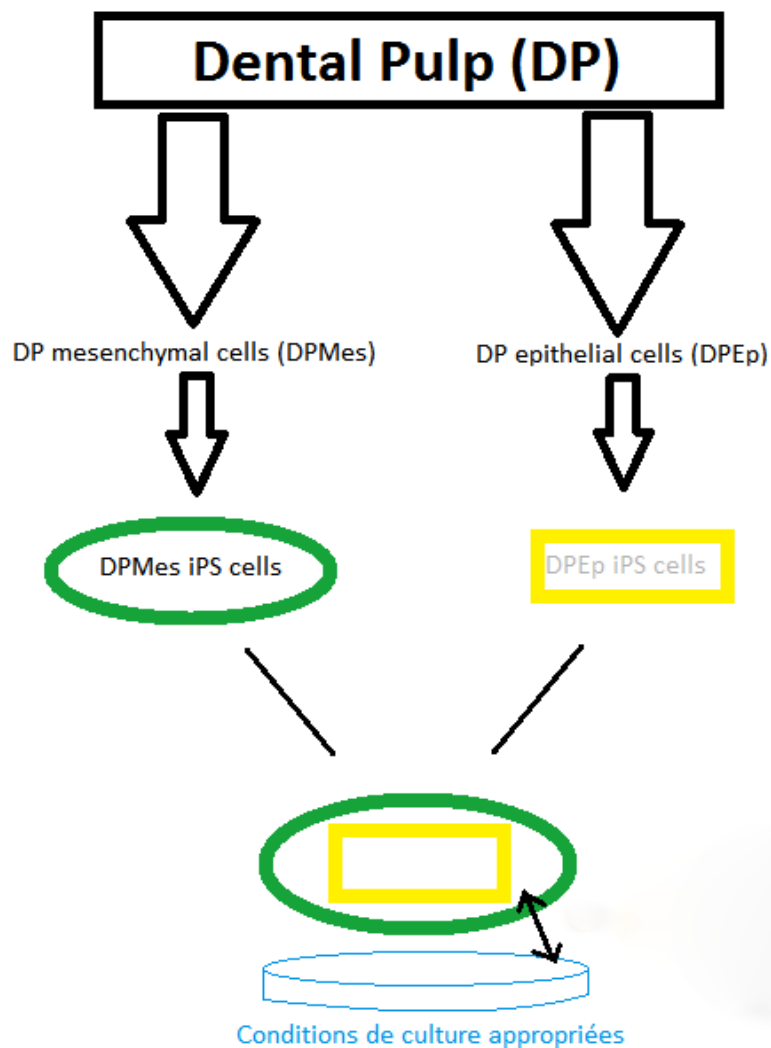
#### **4.3.4. Reprogrammer des DPSC en cellules souches pluripotentes induites (iPSC)**

En 2012 les chercheurs Gurdon et Yamanaka reçoivent le prix Nobel de médecine pour avoir découvert que « les cellules matures peuvent être reprogrammées pour devenir pluripotentes ». Les DPSC, ainsi que les SHED et les SCAP peuvent être reprogrammées en iPSC (Yan *et al.*, 2010). Les tissus dentaires proviennent de l'ecto-mésenchyme et contiennent des cellules progénitrices mésenchymateuses. Afin de reprogrammer les DPSC, 4 facteurs (c-Myc/Klf4/Oct4/Sox2) transportés par des vecteurs viraux sont utilisés. Les résultats montrent des cellules ayant une morphologie semblable aux CSE humaines en culture et exprimant les marqueurs des CSE (SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-80, TRA-2-49, Nanog, Oct4, Sox2) (Yan *et al.*, 2010). La conclusion de l'étude de Yan *et al.* (2010) est que les cellules d'origine ecto-mésenchymateuses sont une excellente source de cellules pour générer des iPSC.

Depuis l'émergence des iPSC en biologie cellulaire, la question est de savoir s'il est nécessaire de reprogrammer les cellules au stade de cellule souche pluripotente pour la thérapie régénérative dentaire. La pluripotence ne devrait pas être un pré-requis pour générer certains types de cellules différenciées. Faire revenir en arrière ces cellules vers un progéniteur commun de base (cellules ecto-mésenchymateuses/cellules des crêtes neurales?) permettrait d'ouvrir des voies vers la spécification cellulaire.

Un autre moyen d'utiliser les iPSC obtenues à partir de DPSC serait de mimer les interactions épithélio-mésenchymateuses. Les DPSC peuvent se différencier en cellules

épithéliales (Nam et Lee, 2009). Après dissociation des fractions épithéliales et mésenchymateuses, ces cellules peuvent être reprogrammées en iPSC-épithéliales et iPSC-mésenchymateuses. Ces deux populations de cellules pluripotentes peuvent être co-cultivées avec un support biomimétique entre elles, de sorte à obtenir des interactions épithélio-mésenchymateuses (**Figure 33**).



**Figure 33.** Une hypothèse de travail sur les interactions épithélio-mésenchymateuses : reprogrammer des cellules épithéliales et mésenchymateuses en iPSC et les cultiver ensemble avec un support (double flèche noire) pour mimer le développement dentaire.

En conclusion, la fabrication d'une pulpe artificielle afin de régénérer partiellement la pulpe est possible chez le rat. Dans le futur, l'objectif est d'étendre cette possibilité à la dent

humaine. Ainsi, la pulpe lésée serait remplacée par la pulpe artificielle issue de cellules souches pulpaire afin d'éviter le traitement endodontique qui est actuellement la thérapeutique préconisée.

# CONCLUSION

Actuellement, les thérapeutiques pour pallier aux pertes de substances dentaires sont des moyens artificiels faisant appel à des restaurations coronaires directes (résine, amalgame, ciment-verre-ionomère...), ou indirectes (céramique, or...).

La découverte de cellules souches résidant au sein du tissu pulpaire en 2000 par l'équipe de Gronthos a permis d'étudier la possibilité de régénérer du tissu pulpaire et dentinaire naturellement lors d'altérations irréversibles de substance minérale de la dent. Les cellules souches issues de la pulpe dentaire sont recrutées en cas d'agression (carie, traumatisme) et sont impliquées dans la réparation dentinaire. Des chercheurs ont pu les isoler et les cultiver. Les expériences actuelles sont réalisées sur des dents de rat ou de cochon miniature car ces dernières sont proches des dents humaines (mêmes réactions inflammatoires, nombreux gènes partagés avec l'homme...).

Il a été montré qu'en associant la triade cellules souches – support de collagène – facteurs de croissance (DMP1), il était possible d'obtenir une organisation tissulaire et une angiogenèse, précurseur de la réparation tissulaire.

Dans un futur proche, le but est d'étendre ces recherches à la clinique humaine tout en maîtrisant les risques inhérents de rejet, d'inflammation et de dégénérescence mitotique. Les premiers essais cliniques sur les CSE démarrent à peine. Les iPSC sont très utiles dans le domaine de la recherche, mais il reste beaucoup à faire avant de pouvoir envisager leur utilisation thérapeutique.

Le clonage à but thérapeutique est interdit en France pour éviter tout risque de dérive. Une seule dérogation a été accordée aux chercheurs pour qu'ils travaillent sur les embryons surnuméraires. La communauté scientifique est plutôt favorable aux recherches sur les cellules souches. Mais au-delà du problème éthique se pose le problème médical. La capacité des cellules souches à se diviser indéfiniment les rend très proches des cellules cancéreuses. Cependant, certaines expériences ont montré qu'il y avait un risque de les voir se transformer en tumeur bénigne ou même maligne (Zhu et Yuan, 2015).

# BIBLIOGRAPHIE

Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Bardoff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeicher AM, Dimmeler S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation*. 2003; 107(16): 2134-2139.

Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, Guicheux J. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblasts-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res*. 2005; 321(3): 391-400.

Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. 2008; 26(7): 1787-1795.

Azikuzi T, Oda S, Komaki M, Tsuchioka H, Kawakatsu N, Kikuchi A, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Application of periodontal ligament stem cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J Periodontal Res*. 2005; 40(3): 245-251.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Comparative analysis of *in vitro* osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*. 2011; 56(7): 709-721.

Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(34): 14234-14239.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004; 30(4): 196-200.

Bartlett JD, Ganss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML. Protein-protein interactions of developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol*. 2006. 74: 57-115.

Beer R, Baumann MA, Kielbassa AM. *Atlas de poche d'endodontie*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences ; 2008. XVI-229 p.

Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76(3): 1274-1278.

Bento LW, Zhang Z, Imai A, Nör F, Dong Z, Shi S, Araujo FB, Nör JE. Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. *J Dent Res*. 2013; 92(1): 51-57.

Bianco P, Rimunicci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001; 19(3): 180-192.

Bletsa A, Fristad I, Berggreen E. Sensory pulpal nerve fibres and trigeminal ganglion neurons express IL-1RI: a potential mechanism for development of inflammatory hyperalgesia. *Int Endod J*. 2009; 42(11): 978-986.

Brix M, Lebeau J. Chapitre 3 : anatomie dentaire. Année universitaire 2011/2012. Université Joseph Fourier de Grenoble.

Cehreli ZC, Sara S, Aksoy B. Revascularisation d'incisives permanents immatures ayant subi un grave traumatisme par luxation en extrusion. *J Can Dent Assoc*. 2012; 78: c4\_f.

Cheng T, Rofrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*. 2000; 287: 1804-1808.

Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod*. 2006; 32(12): 1205-1213.

Cima LG, Vacanti JP, Langer R. Polymers for tissue and organ culture. *J Bioactive Comp. Pol.* 1991; 6: 232-240.

Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z, An Y, Zhang C, Wang S. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells.* 2010; 28(10): 1829-1838.

Eslaminejad MB, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro growth and characterization of stem cells from human dental pulp of deciduous versus permanent teeth. *J Dent (Tehran).* 2010; 7(4): 185-195.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryo. *Nature.* 1981; 292: 154-156.

Farges JC, Romeas A, Melin M, Pin JJ, Lebecque S, Lucchini M, Bleicher F, Magloire H. TGF-beta1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblastic layer. *J Dent Res.* 2003; 82(8): 652-656.

Farges JC. La dentinogenèse [en ligne]. 2011-2012 [consulté le 10/01/2015]. Disponible : <http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=1248161>.

Felhaus O, Viale-Bouroncle S, Driemel O, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C. Transcription factors TP53 and SP1 and the osteogenic differentiation of dental stem cells. *Differentiation.* 2012; 83(1): 10-16.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999. 126: 270-299.

Fitzgerald M, Chiego DJ Jr, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol.* 1990; 35(9): 707-715.

Fitzgerald M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-Thymidine. *J Dent Res.* 1979; 58: 2198-2206.

Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM. Human dental pulp stem cells: improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rat with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 2008; 26(3): 638-645.

Gibbs RA et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004; 428: 493-521.

Gioventu S, Andriolo G, Bonino F, Frasca S, Lazzari L, Montelatici E, Santoro F, Rebulli P. A novel method for banking dental pulp stem cells. *Transfus Apher Sci*. 2012; 47(2): 199-206.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin : structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011; 3: 711-735.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol*. 2004; 15(1): 13-27.

Goldberg M. Histologie du complexe dentino-pulpaire. *EMC Médecine buccale*. 2008; 1-34. [Article 28-115-B-10].

Goldberg M. The dental pulp: biology, pathology and regenerative therapies. Heidelberg : Springer ; 2014. X-282 p.

Goseki M, Oida S, Nifuji A, Sasaki S. Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J Dent Res*. 1990; 69(3): 909-912.

Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, Totey S, Bhonde RR, Abu Kasim NH. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod*. 2010; 36(9): 1504-1510.

Govitvattana N, Osathanon T, Taebunpakul S, Pavasant P. IL-6 regulated stress-induced Rex-1 expression in stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Oral Dis*. 2013; 19(7): 673-682.

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 U S A*. 2000; 97(25): 13625-13630.

Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold PM. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcif Tissue Int*. 2006; 79(5): 310-317.

Gronthos S. The therapeutic potential of dental pulp cells: more than pulp fiction? *Cytotherapy*. 2011; 13(10): 1162-1163.

Hao J, Zou B, Narayanan K, George A. Differential expression pattern of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. *Bone*. 2004; 34(6): 921-932.

Hargreaves KM, Goodis HE. Seltzer and Bender's dental pulp. Chicago : Quintessence Publishing ; 2002. 500 p.

He J, Dahl T, Veis A, George A. Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation *in vitro*. *Connect Tissue Res*. 2003; 44(Suppl 1): 240-245.

Hosoya A, Higara T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshida N, Takahashi M, Ito S, Nakamura H. Thy-1<sup>+</sup> cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol*. 2012; 137(6): 733-742.

Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells*. 2008; 26(10): 2654-2663.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009; 88(9): 792-806.

Huang GT, Sonoyama W, Liu Y. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*. 2008; 34(6): 645-651.

Ikeda E, Yagi K, Kojima M, Yogyuu T, Ohshima A. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*. 2008; 76(5): 495-505.

Inoki R, Kudo R, Olgart LM. Dynamic aspect of dental pulp: molecular biology, pharmacology and pathophysiology. Springer Science & Business Media. 2012. 508 p.

Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis and neurogenesis. *Stem Cells*. 2006; 24(11): 2493-2503.

Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells*. 2008; 26(9): 2408-2418.

Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, Haapasalo M. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features *in vitro*. *J Endod*. 2010; 36(6): 469-474.

Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*. 2001; 17(4): 185-187.

Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I. The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development*. 1998; 125: 161-169.

Johansen E. Microstructure of enamel and dentin. *J Dent Res*. 1964; 43: 1007.

Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res*. 1987; 66(6): 1149-1153.

Kanafi MM, Pal R, Gupta PK. Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of dental pulp stem cells. *Cell Biol Int*. 2013; 37(2): 126-136.

Kawashima N. Characterization of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol.* 2012; 57(11): 1439-1458.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 2006; 184(3-4): 105-116.

Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, Cabral RM, Maranduba CM, Gaiad TP, Morini AC, Vieira NM, Brolio MP, Sant'Anna OA, Miglino MA, Zatz M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic? *J Transl Med.* 2008; 6: 35.

Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67(3): 501-506.

Lasfargues JJ, Colon P. Odontologie conservatrice et restauratrice. Tome 1 : une approche médicale globale. Paris, éditions CdP. 2010. 480 p.

Lemieux M1, Bouchard F, Gosselin P, Paquin J, Mateescu MA. The NCI-N87 cell line as a gastric epithelial barrier model for drug permeability assay. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 412(3): 429-434.

Licht B. Syllabus d'odontologie préventive et conservatrice. Nantes : Université de Nantes. 1999; Tome 2.

Lin G, Liu G, Banie L, Wang G, Ning H, Lue TF, Lin CS. Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells Dev.* 2011; 20(10): 1747-1752.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(5): 679-728.

Liu O, Xu J, Ding G, Liu D, Fan Z, Zhang C, Chen W, Ding Y, Tang Z, Wang S. Periodontal ligament stem cells regulate B lymphocyte function via programmed cell death protein 1. *Stem Cells*. 2013; 31(7): 1371-1382.

Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, Kerkis I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One*. 2012; 7(6): e39885.

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; 37(2): 133-138.

Lynch CD, McConnell RJ. The cracked tooth syndrome. *J Can Dent Assoc*. 2002; 68(8): 470-75.

Maeda T, Iwanaga T, Fujita T, Takahashi Y, Kobayashi S. Distribution of nerve fibers immunoreactive to neurofilament protein in rat molars and periodontium. *Cell Tissue Res*. 1987; 249(1): 13-23.

Magloire H, Couble ML, Romeas A, Bleicher F. Odontoblast primary cilia : facts and hypotheses. *Cell Biol Int*. 2004; 28(2): 93-99.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78: 7634-7638.

Mathieu S, El-Battari A, Dejoui J, About I. Role of injured endothelial cells in the recruitment of human pulp cells. *Arch Oral Biol*. 2005; 50(2): 109-113.

Menicanin D, Bathold PM, Zannettino AC, Gronthos S. Identification of a common gene expression signature associated with immature clonal mesenchymal cell populations derived from bone marrow and dental tissues. *Stem Cells Dev*. 2010; 19(10): 1501-1510.

Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, Isokawa K, Honda MJ. CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(5): 901-913.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(10): 5807-5812.

Mjor IA, Sveen OB, Heyeraas KJ. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence int*. 2001; 32(6): 427-446.

Monteiro BG, Serafim RC, Melo GB, Silva MC, Lizier NF. Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol* 2014; 18(19): 2863-2881.

Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995; 11: 35-71.

Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005; 24(2): 155-165.

Moshaverinia A, Xu X, Chen C, Akiyama K, Snead ML, Shi S. Dental mesenchymal stem cells encapsulated in an alginate hydrogel co-delivery microencapsulation system for cartilage regeneration. *Acta Biomater*. 2013; 9(12): 9343-9350.

Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(6): 509-520.

Nam H, Lee G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 386(1): 135-139.

Nancy A. Ten Cate's oral histology: development, structure and function. 6e ed. St Louis: Mosby. 2003. XI-445 p.

Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A. Differentiation of embryogenic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(8): 4516-4521.

Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z, Karbalaie K, Mousavi SB, Talebi A, Nadali F, Tanhaei S, Kiyani GA, Nematollahi M, Rabiei F, Mardani M, Bahramiyan H, Torabinejad M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H. Induced *in vitro* differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int J Dev Biol*. 2011; 55(2): 189-195.

Okita, K., Hong, H., Takahashi, K., Yamanaka, S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc*. 2010; 5(3): 418-428.

Pan M, Naftel JP, Wheeler EF. Effects of derivation of neonatal nerve growth factor on the expression of neurotrophin receptors and brain-derived neurotrophic factor by dental pulp afferents of the adult rat. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(5): 387-399.

Peterkova R, Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV. Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int J Dev Biol*. 1996; 40: 1009-1016.

Piette E, Goldberg M. La dent normale et pathologique. Bruxelles : De Boeck ; 2001. 392 p.

Piling H, Chao W, Gang L. Circulating mesenchymal stem cells and their clinical implications. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2009; vol 93-B, No 68.

Pinto S, Silveira C, Pochapski M, Pilatt G, Santos F. Effect of desensitizing toothpastes on dentin. *Braz Oral Res*. 2012. Vol 26, No 5.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, John AS, George A. *In vivo* generation of dental pulp-like tissue using human pulpal stem cells, a collagen scaffold and dentin matrix protein 1 following subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008; 34(4): 421-426.

Renon CE. Back to the future in cavity préparation ? *Dent Update*. 1995; 3: 93-95.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic factors in human dentin matrix. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(11): 1013-1016.

Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol*. 1995; 39: 145-152.

Ruch JV. Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *J Dent Res*. 1985; 64: 489-498.

Ruch JV, Lesot H, Karcher-Djuricic V, Meyer JM, Mark M. Epithelial- mesenchymal interactions in tooth germs: mechanisms of differentiation. *J Biol Buccale*. 1983; 11: 173-193.

Sawa Y, Yoshida S, Ashikaga Y, Kim T, Yamaoka Y, Suzuki M. Immunohistochemical demonstration of lymphatic vessels in human dental pulp. *Tissue Cell*. 1998; 30(5): 510-516.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cells. *Blood Cells*. 1978; 4(1-2): 7-25.

Schraufstatter IU, Discipio RG, Khaldoyanidi S. Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Front Biosci* (Landmark Ed). 2011; 16: 2271-2288.

Schwartz SD<sup>1</sup>, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012; 379(9817): 713-720.

Seltzer S, Bender IB. The incidence of bacteremia in endodontic manipulation: preliminary report. *J Endod*. 2003; 29(11): 679-700.

Shekar R, Ranganathan K. Phenotypic and growth characterization of human mesenchymal stem cells cultured from permanent and deciduous teeth. *Indian J Dent Res*. 2012; 23(6): 838-839.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(4): 696-704.

Simon S, Cooper P, Berdal A, Machtou P, Smith AJ. Biologie pulpaire : comprendre pour appliquer au quotidien. *Rev Odont Stomat*. 2008; 37: 209-235.

Simon S, Machtou P, Pertot WJ. Endodontie. Rueil-Malmaison : CDP ; 2012. 514 p.

Simon SR, Tomson PL, Berdal A. Regenerative endodontics: regeneration or repair? *J Endod*. 2014; 40(4 Suppl): S70-75.

Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative médecine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2015; 3(2):1-18.

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: 425-437.

Smith AJ. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006; 441.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. 2006; 1: e79.

Souron JB. Régénération de la pulpe dentaire par ingénierie tissulaire : mise au point d'une "pulpe équivalente". [Thèse de biologie cellulaire]. Université Paris Descartes ; 2013. 97 p. Disponible : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00931703/document>.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988; 241(4861): 58-62.

Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambarà G, De Angelis L, Mancini M, Mitsiadis TA, Vivarelli E, Naro F, Filippini A, Papaccio G. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potential. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(6B): 1635-1644.

Takahashi N, Chosa N, Hasegawa T, Nishihira S, Okubo N, Takahashi M, Sugiyama Y, Tanaka M, Ishisaki A. Dental pulp cells derived from permanent teeth express higher levels of R-cadherin than do deciduous teeth: implications of the correlation between R-cadherin expression and restriction of multipotency in mesenchymal stem cells. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(1): 44-51.

Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4): 663-676.

Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Tamaoki N, Takeda T, Yamanaka S, Takahashi K. Efficient method for establishing induced pluripotent stem cells. N° de publication CA2732401 C. 2008.

Thillay C. La greffe du sang de cordon : une nouvelle pratique en obstétrique. Mémoire de sage femme : Université de Nantes, 2007, 60 p.

Till JE, McCulloch E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961; 14: 213-222.

Trubiani O, Tripodi D, Delle Fratte T, Caputi S, Di Primio R. Human dental pulp vasculogenesis evaluated by CD34 antigen expression and morphological arrangement. *J Dent Res.* 2003; 82(9): 742-747.

Tziafas D, Kolokuris I. Inductive influence of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. *J Dent Res.* 1990; 69(1): 75-81.

Vacanti CA, Cima LG, Rodkowski D, Upton, J. Tissue engineering of new cartilage in the shape of a human ear using specially configured polymers seeded with chondrocytes. *Mater Res Soc Symp Proc.* 1992; 252.

Vakhrushev IV, Suzdaltseva YG, Burunova VV, Karalkin PA, Lupatov AY, Yarygin KN. Mesenchymal cells of the decidual tooth pulp: cytophenotype and initial evaluation of possibility of their use in bone tissue engineering. *Bull Exp Biol Med.* 2010; 149(1):161-166.

Vishwanath VR, Nadig RR, Nadig R, Prasanna JS, Karthik J, Pai VS. Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2013; 16(5): 423–428.

Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and régénération. *Trends Cell Biol*. 2010; 20(12): 715-722.

Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell*. 2010; 6(2): 103-115.

Walton R, Torabinejad M. Principles and practice of endodontics. Philadelphia : Saunders ; 2002. 580 p.

Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, Liu SY, Chen L, Ding Y, Xuan K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*. 2012; 59(9): 1231-1240.

Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Liu D, Liu Y, Zhang C, Shi S, Wang S. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J Cell Physiol*. 2012; 227(9): 3216-3224.

Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod*. 2004; 30(2): 95-99.

Yamamura T, Shimono M, Koike H, Terao M, Tanaka Y, Sakai Y, Inoue T, Yoshiki S, Tachiwaka T, Kawahara H, Watanabe O. Differentiation and induction of undifferentiated mesenchymal cells in tooth periodontal tissue during wound healing and regeneration. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1980; 21(3): 181-221.

Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S, Shi S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther*. 2010; 1(1): 5.

Yan X1, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(4): 469-80.

Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008; 87(8): 767-771.

Yildirim S, Yapar M, Kubar A. Detection and quantification of herpesviruses in Kostmann syndrome periodontitis using real-time polymerase chain reaction: a case report. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(2): 73-78.

Yildirim S. Dental pulp stem cells. 2012.

Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H, Li Y, Jin Y. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng.* 2006; 12(11): 3097-3105.

Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci.* 2008; 33(4): 161-170.

Zhu YY, Yuan Z. Pancreatic cancer stem cells. *Am J Cancer Res.* 2015; 5(3): 894-906.

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

# Index des figures

Figure 1. Schéma récapitulatif de l'odontogenèse ( <a href="http://www.arquivos.unama.br">www.arquivos.unama.br</a> )	18
Figure 2. La dent et son parodonte (Piette et Goldberg, 2001)	20
Figure 3. Représentation schématique de l'imbrication des prismes de l'émail (VonTasha, 2006)	22
Figure 4. Prismes de l'émail en microscopie électronique à balayage (Leloup, 2007)	22
Figure 5. Microphotographies en microscopie optique d'émail humain sur des coupes de dents calcifiées préparées par usure montrant l'orientation des stries de Retzius (Piette et Goldberg, 2001)	22
Figure 6. Coupe de dentine observée au microscope électronique à balayage obtenue après fracture verticale d'une dent de chat (Leloup, 2007)	25
Figure 7. Dentine pérítubulaire, intertubulaire, et tubuli dentinaires observés microscope électronique à balayage (Pinto et al., 2012)	26
Figure 8. Les différentes couches de dentine dans une dent	27
Figure 9. Coupe histologique frontale d'une molaire de souris ayant été traitée avec une obturation coronaire (Simon et al., 2008)	29
Figure 10. Les deux types de réparation dentinaire	30
Figure 11. Cavité pulpaire (Dore, 2011)	32
Figure 12. Mise en évidence des odontoblastes alignés le long de l'interface dentino-pulpaire (Licht, 1999)	33
Figure 13. Schéma représentant deux odontoblastes sécréteurs (Linde et Goldberg, 1993)	34
Figure 14. Vaisseaux sanguins de la région coronaire observés au microscope électronique à balayage (Inoki et al., 2012)	39
Figure 15. Observation de la vascularisation d'une molaire de chien observée au microscope électronique à balayage (Inoki et al., 2012)	40
Figure 16. Auto-renouvellement et différenciation d'une CSH en cellule progénitrice lymphoïde ou myéloïde (© Parions Sciences, 2013)	42
Figure 17. La première lignée de CSE en France dérivée en octobre 2007 à partir d'un embryon non viable (© unité INSERM 602)	45
Figure 18. L'introduction des quatre facteurs de transcription permet de reprogrammer une cellule somatique en iPSC (Singh et al., 2015)	46
Figure 19. Rétine atteinte de DMLA (Dr Serny)	47

Figure 20. CSM de la pulpe dentaire en culture (Shekar et Ranganathan, 2012)	51
Figure 21. Développement des transplants après six semaines <i>in vivo</i> (Gronthos et al., 2000)	52
Figure 22. Photographie de papilles apicales issues d'une dent de sagesse incluse (Huang et al., 2008)	68
Figure 23. Photographie d'une molaire immature de cochon miniature (Chueh et Huang, 2006)	69
Figure 24. Coupe d'un bourgeon dentaire (Dozenist, 2005)	71
Figure 25. Souris immunodéprimée avec l'implant sous-cutané dans la partie dorsale (Prescott et al., 2008)	78
Figure 26. Coupes observées au microscope optique (Prescott et al., 2008)	79
Figure 27. Cellules pulpaire de rat en culture et cellules pulpaire humaine (Souron, 2013)	82
Figure 28. Coupe d'une matrice cellularisée implantée en sous-cutané chez le rat immunodéprimé (Souron, 2013)	83
Figure 29. Observation au microscope optique de l'implantation des matrices dans la première molaire de rat (Souron, 2013)	83
Figure 30. Analyse au SPECT+CT d'une matrice cellularisée implantée dans la première molaire de rat à J0, J7, J14 et J21 (Souron, 2013)	85
Figure 31. Coupes des matrices au bout d'un mois (Souron, 2013)	86
Figure 32. Visualisation des molaires de rat par technique de micro-scanner au bout d'un mois (Souron, 2013)	86
Figure 33. Une hypothèse de travail sur les interactions épithélio-mésenchymateuses	88

## **Index des tableaux**

Tableau 1. Analyse immunohistochimique des DPSCs et BMSCs in vitro (Gronthos et al., 2000). ....	53
Tableau 2. Milieu de culture nécessaire pour obtenir la différenciation des cellules souches en ostéoblaste, chondrocyte ou adipocyte. ....	56
Tableau 3. Milieux d'isolation des IDPSCs et des SHEDs. ....	60
Tableau 4. Les deux milieux de culture des cellules souches les plus fréquemment utilisés. ....	61

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

(Classées par ordre alphabétique)

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALP	Phosphatase alcaline
ARN	Acide RiboNucléique
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP	Protéine morphogénétique osseuse ( <i>Bone Morphogenetic Protein</i> )
BMSC	Cellules souches de la moelle osseuse ( <i>Bone Marrow Stem Cells</i> )
BSP	Sialoprotéine osseuse ( <i>Bone SialoProtein</i> )
CCN	Cellules ces crêtes neurales
CD	Cluster de différenciation
CNPase	<i>Cyclic-Nucleotide Phosphodiesterase</i>
CNTF	Facteur neurotrophique ciliaire ( <i>Ciliary NeuroTrophic Factor</i> )
CSE	Cellules Souches Embryonnaires
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSM	Cellules Souches Mésenchymateuses
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif ( <i>Connective Tissue Growth Factor</i> )
DFPC	Cellules souches issues du follicule dentaire ( <i>Dental Follicul Precursor Cells</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMP	Protéine de la matrice dentinaire ( <i>Dentin Matrix Protein</i> )
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPP	Phosphoprotéine dentinaire ( <i>Dentin PhosphoProtein</i> )
DPSC	Cellules souches de la pulpe dentaire ( <i>Dental Pulp Stem Cells</i> )
DSP	Sialoprotéine dentinaire ( <i>Dentin SialoProtein</i> )
DSPP	Sialophosphoprotéine dentinaire ( <i>Dentin SialoPhosphoProtein</i> )
EAE	Épithélium améloblastique externe
EAI	Épithélium améloblastique interne
EDI	Épithélium dentaire interne
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
FBS	Sérum fœtal bovin ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes ( <i>Fibroblaste Growth Factor</i> )
FGFR3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>
GAD	Glutamate décarboxylase
GM-CSF	Facteur de croissance granulocytaire et des macrophages ( <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )
GDNF	<i>Glial cell line Derived Neurotrophic Factor</i>
HA/TCP	HydroxyApatite/Tri-Calcium-Phosphate
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
IBMX	IsoButylMethylXantine
ICA	Cellules des îlots pancréatiques ( <i>Islet-like Cells Aggregates</i> )
IGF	Facteur de croissance apparenté à l'insuline ( <i>Insulin-like Growth Factor</i> )
IL	InterLeukine
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites ( <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i> )
LPL	<i>LipoProtein Lipase</i>
MEC	Matrice Extra-Cellulaire

MMP	Métalloprotéinase matricielle ( <i>Matrix MetalloProteinase</i> )
MTA	<i>Mineral Trioxide Aggregate</i>
MUC	Marqueur de mucosécrétion
NGF	Facteur de croissance des nerfs ( <i>Nerve Growth Factor</i> )
OPN	Ostéopontine
PCNA	Agent de prolifération nucléaire ( <i>Proliferating Cell Nuclear Agent</i> )
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDLSC	Cellules souches du ligament parodontal ( <i>PerioDontal Ligament Stem Cells</i> )
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
SCAP	Cellules souches de la papille apicale ( <i>Stem cells from the Apical Papilla</i> )
SHED	Cellules souches de dents déciduales exfoliées ( <i>Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth</i> )
SHH	<i>Sonic HedgeHog</i>
SPECT	<i>Single Photo Emission Computed Tomography</i>
STRO1	Marqueur stromal
TGF	Facteur de croissance transformant ( <i>Transforming Growth Factor</i> )
TNF	Facteur de nécrose tumorale ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

**FLEURENTIN Julia – Ingénierie tissulaire et cellules souches pulpaire**

NANCY 2015: 112 p.; 33 ill.

Th.: Chir-Dent.: NANCY I: 2015

Mots-clés: pulpe dentaire, cellules souches, ingénierie tissulaire.

**FLEURENTIN Julia – Ingénierie tissulaire et cellules souches pulpaire**

Th.: Chir-Dent.: NANCY I: 2015

La dent est sujette a de nombreuses agressions qui entraînent des altérations irréversibles de sa substance minérale, parfois accompagnées de processus inflammatoire et/ou infectieux qui, sans traitement, peuvent aboutir à la perte de la dent.

Les alternatives actuellement utilisées sont des moyens artificiels tels que les restaurations coronaires et prothétiques qui remplacent le tissu lésé mais qui ne restaurent pas son intégrité ni sa fonction propre.

Depuis 2000, des études ont permis de mettre en évidence la présence de cellules souches dans la pulpe dentaire :

- cellules souches issues de la pulpe dentaire des dents permanentes DPSC (*Dental Pulp Stem Cells*)
- cellules souches issues de la pulpe de dents temporaires exfoliées SHED (*Stem cells from Exfoliated Deciduous teeth*)

Dans le futur, avec l'aide de la bioingénierie tissulaire, la thérapeutique vise la mise au point de nouvelles stratégies de réparation/préservation basées sur une approche naturelle d'auto-réparation de la dent.

L'objectif de ce travail est de décrire les bases fondamentales amenées à révolutionner notre comportement clinique dans un futur proche.

**JURY:**

Monsieur P. AMBROSINI	Professeur des universités	Président
<u>Monsieur M. ENGELS-DEUTSCH</u>	Maître de Conférences des universités	<u>Directeur</u>
Madame V. STUTZMANN-MOBY	Maître de Conférences des universités	Juge
<u>Monsieur M. VINCENT</u>	Assistant hospitalier universitaire	<u>Codirecteur</u>
Madame P. NICOLAS-FLEURENTIN	Docteur en chirurgie dentaire	Invitée

Nom et adresse de l'auteur :

FLEURENTIN Julia  
26, chemin des mages  
57160 SCY-CHAZELLES

Jury :     Président : P.AMBROSINI – Professeur des Universités  
              Juges :     M. ENGELS-DEUTSCH – Maître de Conférences des Universités  
                              V.MOBY – Maître de Conférences des Universités  
                              M.VINCENT – Assistant Hospitalier Universitaire  
                              P. NICOLAS- FLEURENTIN – Docteur en Chirurgie Dentaire

Thèse pour obtenir le diplôme D'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

Présentée par: Mademoiselle FLEURENTIN Julia, Olivia, Renée

né(e) à: METZ (Moselle)

le 11 octobre 1989

et ayant pour titre : « Ingénierie tissulaire et cellules souches pulaires ».

Le Président du jury



P.AMBROSINI

Le Doyen  
de la Faculté d'Odontologie



J.M. MARTRETT

Autorise à soutenir et imprimer la thèse 7016

NANCY, le

30 JUIN 2015

Pour le Président et par délégation  
Le Vice-Président  
Le Président de l'Université de Lorraine



P. MUTZENHARDT

