

Année 2022

N° 3839

**ÉTUDE COMPARATIVE DE DIFFÉRENTS CEMENTS  
SILICATE DE CALCIUM SUR LA POLARISATION DES  
MACROPHAGES**

THÈSE D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Olivier LAPÉRINE**

*Le 18/10/2022 devant le jury ci-dessous*

Présidente de jury : Madame la Professeur PEREZ Fabienne

Assesseur : Monsieur le Professeur LESCLOUS Philippe

Assesseur : Madame la Docteur DUPAS Cécile

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur GAUDIN Alexis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br><b>Nantes Université</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <u>Présidente</u><br>Pr. BERNAULT Carine                                                                                                                                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <u>Doyen</u><br>Pr. SOUEIDAN Assem                                                                                                                                                                                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <u>Assesseurs</u><br>Pr GAUDIN Alexis<br>Pr LE GUEHENNEC Laurent<br>Pr LESCLOUS Philippe                                                                                                                                    |
| <b>Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers des C.S.E.R.D</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                             |
| ALLIOT-LICHT Brigitte<br>AMOURIQ Yves<br>CHAUX Anne-Gaëlle<br>GAUDIN Alexis<br>LABOUX Olivier<br>LE GUEHENNEC Laurent                                                                                                                                                                                                                                                                             | LESCLOUS Philippe<br>LOPEZ Serena<br>PEREZ Fabienne<br>SOUEIDAN Assem<br>WEISS Pierre                                                                                                                                       |
| <b>Professeur des Universités</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                             |
| BOULER Jean-Michel                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Maitre de conférence des Universités</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                             |
| VINATIER Claire                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Professeur Emérite</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                             |
| GIUMELLI Bernard                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Enseignants Associés</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                             |
| GUIHO Romain (Professeur Associé)<br>LOLAH Aoula (MCU Associé)<br>MAITRE Yoann (MCU Associé)                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | AMICHIA ALLOH Yomin Cécile (Assistant Associé)<br>BANDIAKY Octave (Assistant Associé)<br>IDIRI Katia (Assistant Associé)                                                                                                    |
| <b>Maitres de conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers des C.S.E.R.D</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>Chef de Clinique des Universités - Assistant des Hôpitaux des C.S.E.R.D</b>                                                                                                                                              |
| AMADOR DEL VALLE Gilles<br>ARMENGOL Valérie<br>BLERY Pauline<br>BODIC François<br>CLOITRE Alexandra<br>DAJEAN-TRUTAUD Sylvie<br>ENKEL Bénédicte<br>HOORNAERT Alain<br>HOUCHMAND-CUNY Madline<br>JORDANA Fabienne<br>LE BARS Pierre<br>NIVET Marc-Henri<br>PRUD'HOMME Tony<br>RENARD Emmanuelle<br>RENAUDIN Stéphane<br>RETHORE Gildas<br>SERISIER Samuel<br>STRUILLLOU Xavier<br>VERNER Christian | BLEU Oriane<br>CLOUET Roselyne<br>EVRARD Lucas<br>GUILLEMIN Maxime<br>HASCOET Emilie<br>HEMMING Cécile<br>HIBON Charles<br>OYALLON Mathilde<br>PREVOT Diane<br>QUINSAT Victoire Eugenie<br>REMAUD Matthieu<br>REMAUD Thomas |
| <b>Praticiens Hospitaliers</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                             |
| DUPAS Cécile                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | HYON Isabelle                                                                                                                                                                                                               |

*Par délibération, en date du 6 décembre 1972, le Conseil de 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'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation*

## **REMERCIEMENTS**

### **A Madame le Professeur Fabienne PEREZ**

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de soins d'Enseignement et de Recherche Dentaires

Docteur de l'Université de Toulouse 3

Habilitée à Diriger des Recherches

Chef du Département d'Odontologie Conservatrice – Endodontie

Chef de service d'Odontologie Conservatrice et Pédiatrique

- NANTES -

Pour la qualité de vos enseignements théoriques et cliniques,  
Pour votre rigueur et votre implication dans la formation des étudiants,  
Pour m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse d'exercice,  
Veuillez trouver mes plus profonds remerciements.

**A Monsieur le Professeur Philippe LESCLOUS**

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de Soins d'Enseignement et de Recherche Dentaires

Docteur de l'Université de Paris Descartes

Habilitation à Diriger des Recherches

Chef du Département de Chirurgie Orale

**- NANTES -**

Pour la qualité de vos enseignements théoriques et cliniques,  
Pour m'avoir fait confiance dès notre rencontre,  
Pour m'avoir transmis l'envie de faire ce métier,  
Veuillez trouver toute ma gratitude et mes sincères remerciements.

**A Monsieur le Docteur Alexis Gaudin**

Docteur en Chirurgie Dentaire

Maitre de Conférences des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de soins d'Enseignement et de Recherche Dentaires

Docteur de l'Université de Nantes

Ancien Interne des Hôpitaux de Toulouse

Département d'Odontologie Conservatrice – Endodontie

**- NANTES -**

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse.  
Pour m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse,  
Pour la qualité de ton enseignement théorique et clinique,  
Pour ta bonne humeur et ta passion pour la recherche,  
Trouve ici mes plus sincères remerciements.

**A Madame le Docteur Cécile DUPAS**

Odontologue des hôpitaux

Ancien Assistant Hospitalier Universitaire des Centres de Soins d'Enseignement et de Recherche Dentaires

Praticien Hospitalier des Centres de Soins d'Enseignement et de Recherche Dentaires

Service Odontologie Conservatrice et Pédiatrique

Responsable UF Odontologie de l'Unité Sanitaire en Milieu Pénitentiaire

Service Mission Santé Publique

- NANTES -

Pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury,  
Pour la qualité de vos enseignements théoriques et pratiques,  
Pour votre dévouement et la transmission de votre savoir notamment en PMF,  
Veuillez trouver toute ma gratitude et mes sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur Jérôme Guicheux,**

Directeur de Recherche

Directeur de l'UMRS Inserm 1229 laboratoire RMES,

Pour m'avoir permis de remettre un pied dans la science,

Pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire,

Pour tes conseils avisés en toutes circonstances,

Trouve ici mes plus sincères remerciements.

**A Monsieur Boris Halgand et Madame Solène Tessier,**

Pour m'avoir accueilli de nouveau dans l'unité,

Pour avoir eu la patience de me re-enseigner la culture cellulaire et la RT-qPCR,

Pour vos conseils, votre rigueur, votre bonne humeur et votre gentillesse,

Veillez recevoir mes sincères remerciements et mon plus profond respect.

**A l'ensemble des membres de l'unité Inserm 1229 Laboratoire RMES,**

Pour votre accueil, votre gentillesse,

Pour votre bienveillance lors de ce stage bénévole.

## **TABLE DES MATIERES**

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| REMERCIEMENTS .....                                                 | 4  |
| INTRODUCTION.....                                                   | 10 |
| INTRODUCTION.....                                                   | 12 |
| MATERIALS AND METHODS .....                                         | 14 |
| I.    Preparation of silicate cement solutions.....                 | 14 |
| II.   Culture of THP-1 cell line and macrophage polarization .....  | 14 |
| III.   CCK8 viability assay.....                                    | 14 |
| IV.   RT-qPCR analysis.....                                         | 15 |
| V.    Cytokine quantification using Luminex <sup>®</sup> assay..... | 15 |
| VI.   Statistical analysis .....                                    | 16 |
| RESULTS .....                                                       | 17 |
| DISCUSSION .....                                                    | 20 |
| DISCUSSION .....                                                    | 22 |
| CONCLUSION .....                                                    | 24 |
| REFERENCES.....                                                     | 25 |
| LISTE DES FIGURES .....                                             | 28 |
| LISTE DES TABLES.....                                               | 28 |

## INTRODUCTION

Les matériaux à base de silicate de calcium présentent un large éventail d'applications dans les procédures dentaires telles que l'obturation des canaux radiculaires, le traitement des perforations, le traitement des résorptions internes et externes ou les thérapeutiques de vitalité pulpaire. Ces matériaux utilisés sous forme de ciments ont été largement utilisés depuis l'introduction de l'agrégat de trioxyde minéral (MTA) en 1993 (1). Le MTA est un dérivé de la formulation du ciment de Portland et contient des additifs de remplissage d'oxyde de bismuth, de carbonate de calcium et de gypse (2). Les propriétés du MTA proviennent de la libération d'hydroxyde de calcium lors de sa réaction de prise entraînant une alcalinisation du milieu environnant favorisant la formation de tissu minéralisé et ayant une action antimicrobienne (3,4). L'autre avantage notable du MTA vient du fait que sa réaction de prise se fait par hydratation et est donc facilitée en milieu humide notamment pour le traitement de perforations.

L'un des matériaux dérivés du MTA qui a été introduit sur le marché en 2010 est la Biodentine<sup>TM</sup>. Initialement produite en tant que substitut dentinaire et principalement utilisée lors de thérapeutiques de vitalité pulpaire, la Biodentine<sup>TM</sup> est aujourd'hui utilisée lors de traitement de perforations radiculaires, de traumatisme et également pour la pulpotomie de dents temporaires (5–7). C'est un ciment hydraulique trisilicate de calcium (HSC) possédant des propriétés de résistance mécanique supérieures au MTA, de meilleures propriétés optiques et une prise nettement accélérée par rapport au MTA. Ces avantages ont contribué à la diffusion et la large utilisation dans la pratique dentaire quotidienne.

Plus, récemment, afin de répondre à la problématique de l'étanchéité apicale lors de traitements endodontiques, un nouveau ciment HSC a été mis sur le marché : il s'agit du Bioroot<sup>TM</sup> RCS. Ce ciment permet une obturation canalaire étanche grâce à sa réaction de prise pouvant induire une minéralisation à partir de progéniteurs d'ostéoblastes, des fluides intra canaux ou du phosphate contenu dans la dentine. Il possède également des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires grâce à une augmentation du pH lors de son insertion dans les canaux des racines dentaires (8). Les ciments hydrauliques silicate de calcium (Bioroot<sup>TM</sup> RCS, Biodentine<sup>TM</sup>, MTA ...) ont pour objectifs de garantir la pérennité du traitement chimio mécanique effectué et permettre une procédure d'obturation simplifiée des traitements endodontiques.

Lors d'atteintes carieuses coronaires ou d'infection intra-canales, une inflammation se met en place en réponse à l'agression tissulaire. Celle-ci comporte tout d'abord une phase dite aigüe où les cellules résidentes vont libérer des cytokines permettant le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'inflammation. Ces cellules recrutées vont être principalement des macrophages, des monocytes et des neutrophiles (9,10).

Dans un premier temps, des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  vont permettre le recrutement et la polarisation de cellules immunitaires (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T, etc...) permettant de combattre l'infection (11). Après élimination de l'agent causal et si les conditions sont favorables, une phase de résolution de l'inflammation va se mettre en place, sous l'influence de cytokines telles que l'IL-4 ou encore l'IL-10 qui vont permettre un retour à l'homéostasie tissulaire. Les ciments HSC doivent donc posséder des propriétés anti-inflammatoires importantes afin de permettre la résolution de l'inflammation par les cellules locales et les cellules recrutées sur le site

inflammatoire tel que les macrophages afin de favoriser l'homéostasie et la cicatrisation tissulaire par rapport aux ciments « classiques » (12).

Les macrophages ont été décrits comme étant les premiers types cellulaires à rencontrer les biomatériaux introduits permettant d'initier la réponse inflammatoire de l'hôte (13). Leurs rôles dans la réponse inflammatoire et le retour de l'homéostasie tissulaire locale est majeur grâce à leur capacité de phagocytose et de polarisation en macrophages anti-inflammatoires (14,15).

Bien que de nombreux types de macrophages ont été décrits avec des caractéristiques et phénotypes différents, deux phénotypes majeurs se dégagent : les macrophages pro-inflammatoires appelés M1 et les macrophages activés alternativement dits M2. Les macrophages M1 favorisent la destruction des agents pathogènes grâce à leur activité phagocytaire et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires associées à l'inflammation aiguë, comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . Les macrophages M2 sont connus pour résoudre l'inflammation en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et l'IL-4 favorisant la réparation tissulaire et le retour à l'homéostasie (14,16).

Malgré l'utilisation quotidienne des ciments HSC en clinique, leur capacité à résoudre l'inflammation et les mécanismes permettant cette résolution, notamment via la polarisation des macrophages, sont peu décrits et relativement méconnus à l'heure actuelle. Dans leur étude, *Loison-Robert et al.* (17) ont mis en évidence que Biodentine<sup>TM</sup> et Bioroot<sup>TM</sup> RCS favorisent la prolifération des cellules souches de la pulpe dentaire associée à l'expression de gènes odontoblastiques (18). D'autre part, *Da Silva et al.* (19) ont montré que les ciments endodontiques tels que le Bioroot<sup>TM</sup> RCS induisent la polarisation des macrophages vers un phénotype hybride exprimant à la fois des marqueurs des macrophages M1 et M2. Également, *Braga et al.* ont démontré que le MTA-fillapex, un ciment HSC à base de MTA, diminuait le nombre de macrophages M1 et M2 viables *in vitro* (20).

A l'heure actuelle, encore peu d'études se sont intéressées au potentiel anti-inflammatoire de ces ciments HSC. Afin d'étayer ces données, nous avons donc décidé dans cette étude de comparer les effets indirects de ces deux ciments sur une population de macrophages naïfs M0 *in vitro* afin de vérifier leurs propriétés anti-inflammatoires et également si la Biodentine<sup>TM</sup> et le Bioroot<sup>TM</sup> RCS ont un effet similaire.

## INTRODUCTION

Calcium silicate materials have a wide range of applications in dental procedures such as root canal filling, perforation treatment, treatment of internal and external resorptions or pulp vitality therapy. These materials used as cements have been widely used since the introduction of the mineral trioxide aggregate (MTA) in 1993 (1). MTA is a derivative of the Portland cement formulation and contains filler additives of bismuth oxide, calcium carbonate and gypsum (2). The properties of MTA are derived from the release of calcium hydroxide during its setting reaction resulting in alkalinization of the surrounding environment, promoting the formation of mineralized tissue and having an antimicrobial action (3,4). The other notable advantage of MTA is that its setting reaction is by hydration and is therefore facilitated in a humid environment, particularly for the treatment of perforations.

One of the MTA-derived materials that was introduced to the market in 2010 is Biodentine™. Initially produced as a dentin substitute and mainly used in pulp vitality therapy, Biodentine™ is now used in the treatment of root perforations, trauma and also for pulpotomy of temporary teeth (5-7). It is a hydraulic calcium trisilicate (HSC) cement with superior mechanical strength properties to MTA, better optical properties and significantly accelerated setting compared to MTA. These advantages have contributed to its widespread use in daily dental practice.

More recently, in order to address the problem of apical sealing during endodontic treatment, a new HSC sealer has been launched on the market: Bioroot™ RCS. This new sealer should allow a tight root canal filling thanks to its setting reaction which can induce mineralization from osteoblast progenitors, intra-root fluids or phosphate contained in the dentine. It also has antimicrobial and anti-inflammatory properties due to an increase in pH when inserted into dental root canals (8). The objectives of these calcium silicate hydraulic sealers (Bioroot™ RCS, Biodentine™, MTA...) are to guarantee the durability of the chemo-mechanical treatment performed and to allow a simplified obturation procedure for endodontic treatments.

In the case of caries damage or intra-canal infection, inflammation occurs in response to the tissue attack. This firstly includes an acute phase in which the resident cells release cytokines which allow the recruitment of immune cells to the site of the inflammation. These recruited cells are mainly macrophages, monocytes and neutrophils (9,10). Initially, pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  allow the recruitment and polarization of immune cells (monocytes, macrophages, dendritic cells, T lymphocytes, etc.) to combat the infection (11). After elimination of the causal agent and if conditions are favorable, a phase of resolution of the inflammation will take place, under the influence of cytokines such as IL-4 or IL-10 which will allow a return to tissue homeostasis. HSC cements must therefore have significant anti-inflammatory properties to allow resolution of the inflammation by local cells and cells recruited to the inflammatory site such as macrophages in order to promote tissue homeostasis and healing compared to "conventional" cements (12).

Macrophages have been described as the first cell types to encounter introduced biomaterials to initiate the host inflammatory response (13). Their role in the inflammatory response and the restoration of local tissue homeostasis is major due to their ability to phagocytose and polarize into anti-inflammatory macrophages (14,15). Although many types of macrophages have been described with different characteristics and phenotypes, two major phenotypes stand out: pro-inflammatory macrophages called M1 and

alternatively activated macrophages called M2. M1 macrophages promote pathogen destruction through phagocytic activity and secretion of pro-inflammatory cytokines associated with acute inflammation, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . M2 macrophages are known to resolve inflammation by secreting anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and IL-4 promoting tissue repair and return to homeostasis (14,16).

Despite the daily use of HSC cements in the clinic, their ability to resolve inflammation and the mechanisms by which they do so, particularly via macrophage polarization, are poorly described and relatively unknown at present. In their study, Loison-Robert *et al* (17) demonstrated that Biodentine<sup>TM</sup> and Bioroot<sup>TM</sup> RCS promote the proliferation of dental pulp stem cells associated with the expression of odontoblastic genes (18). On the other hand, Da Silva *et al* (19) showed that endodontic sealers such as Bioroot<sup>TM</sup> RCS induce macrophage polarization towards a hybrid phenotype expressing both M1 and M2 macrophage markers. Also, Braga *et al.* demonstrated that MTA-fillapex, an MTA-based HSC cement, decreased the number of viable M1 and M2 macrophages *in vitro* (20).

At present, few studies have investigated the comparison of anti-inflammatory potential of these HSC cements and sealers. In order to substantiate these data, we decided in this study to compare the indirect effects of these HSC on a population of naive M0 macrophages *in vitro* in order to verify their anti-inflammatory properties and also whether Biodentine<sup>TM</sup> and Bioroot<sup>TM</sup> RCS have a similar effect.

## MATERIALS AND METHODS

### I. Preparation of silicate cement solutions

Materials used in this study were Bioroot™ RCS and Biodentine™ (Septodont™, St Maur des fossés, France). All materials were mixed according to the manufacturer instructions under aseptic conditions into silicone's molds 6mm in diameter and 3mm height and then placed in a humid chamber at 37°C for 24 hours.

After 24 hours of setting, biomaterials were placed in 1mL complete RPMI 1640 medium in accordance with ISO 10993-12 (21) during 24 hours to obtain conditioned medium (CM) then filtered at 22µm before experiments (Figure1).

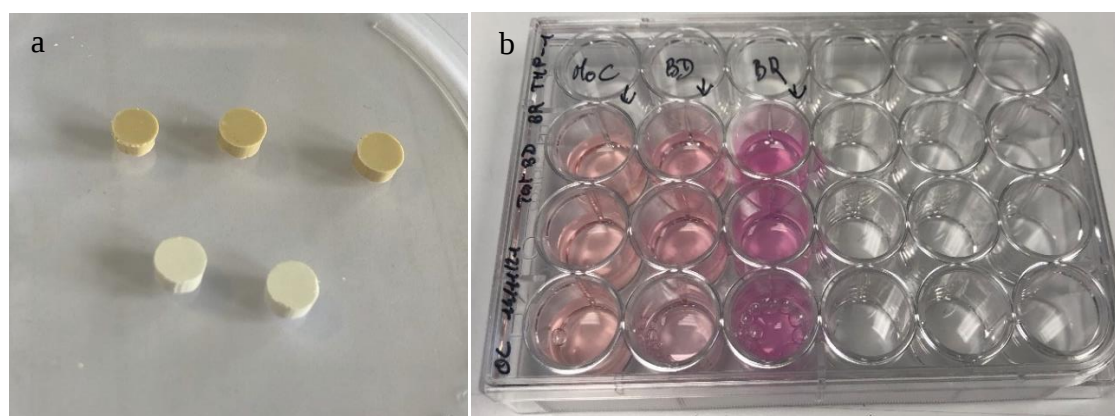


Figure 1: Biodentine™ and Bioroot™ RCS were put in silicone mold for 24 hours to set (a). After setting cements were cultured in RPMI1640 medium to obtain conditioned media before cell experiment. M0c: Control, BD: Biodentine™, BR: Bioroot™ RCS (b).

### II. Culture of THP-1 cell line and macrophage polarization

THP-1 (ATCC® TIB-202) cells were seeded at 300.10\*3 cell/well in 24 well plate in complete culture medium (RPMI 1640 medium (Thermo Fischer Scientific) supplemented with 10% FBS and 00 IU/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin.

To induce the differentiation of THP-1 cells into M0 macrophage, PMA (100nM) was added 24h before experiments with calcium phosphate cements in each well. After 24 hours, conditioned medium of Bioroot™ RCS and Biodentine™ were added for 24h on M0 macrophages, complete medium was added in control wells. After 24h with CM, cells were washed with PBS and mRNA extraction was realised using the RNA midi kit extraction (Macherey-Nagel).

### III. CCK8 viability assay

To assess the effects of Biodentine™ and Bioroot™ RCS on cell viability, we used CCK8 cell viability assay. Briefly, after cultivation for 24 h with biomaterials, the culture medium was replaced with 440uL of complete RPMI medium and 10% (v/v) CCK-8 solution per well.

After 3h of incubation at 37 °C, the absorbance was measured at 450 nm using an absorbance microplate reader. DMSO 50% v/v was used as a positive control.

#### IV. RT-qPCR analysis

To investigate the potential effect of Biodentine™ and Bioroot™ RCS on macrophage polarization, real-time PCR was used to measure the expression levels of genes encoding specific markers of the inflammation and macrophages markers. Total RNA was prepared with Nucleospin RNA midi extraction kit followed by Nucleospin RNA columns (Macherey–Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions.

A 0.3 µg quantity of the total RNA was reverse transcribed and analysed using a Bio-Rad CFX96 detection system using SYBR Select Master Mix (Thermo Fischer Scientific). The relative mRNA expression was normalized to the expression of the SDHA and HBMS housekeeping genes and calculated using the 2<sup>-ΔCt</sup> method with Bio-Rad CFX Manager software. The primer sequences and the names of the target and the housekeeping genes are indicated in Table 1

|              |                                |
|--------------|--------------------------------|
| <b>TNFα</b>  | 5'-cagcctcttctccttctgat-3'     |
|              | 5'-gccagagggctgattagaga-3'     |
| <b>IL-1β</b> | 5'-ccgggactcacagcaaaa-3'       |
|              | 5'-ggacatggagaacaccacttg-3'    |
| <b>IL-6</b>  | 5'-tccacaagcgcttcggtcca g-3'   |
|              | 5'-ctcagggctgagatgccgtcg-3'    |
| <b>HMBS</b>  | 5'-accaaggagcttgaacatgc-3'     |
|              | 5'-gaaagacaacagcatcatgag-3'    |
| <b>SDHA</b>  | 5'-tggaacaagagggcatctg-3'      |
|              | 5'-ccaccactgcatcaaattcatg-3'   |
| <b>IL-10</b> | Quiagen                        |
| <b>CD163</b> | 5'-ggagtgcctgctcagatgg-3'      |
|              | 5'-ccccaccgtccttgaattt-3'      |
| <b>CD206</b> | 5'- agccaacaccagctcctcaaga-3'  |
|              | 5' -caaaacgctcgcgcattgtcca- 3' |

Table 1: Primers sequences used for RT-qPCR analysis

#### V. Cytokine quantification using Luminex® assay

IL-1β, TNF-α and IL-6 (M1 phenotype markers) and IL-10, IL1RA and Arginase (M2 phenotype markers) concentrations were measured in the cell supernatants using Luminex® assay Biolegend kit (Biolegend, San Diego CA). Assays were performed in 96 well plate, in duplicate, following the manufacturer instructions.

Cytokine's concentrations were quantified using the Luminex Assay Software.

## VI. Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (Graph-Pad, San Diego, USA). Statistical significance was determined using Mann-Whitney test. stated otherwise, the experiments were repeated at least 4 times. The results are presented as means  $\pm$  the SD. Results were considered significant with a p value  $<0.05$  (on graphs:  $p<0.05$ : \*;  $p<0.01$ : \*\*;  $p<0.001$ : \*\*\*).

## RESULTS

### CCK8 viability assay

The CCK8 cell viability assay showed an important downregulation of M0 macrophages cell viability for wells treated with Bioroot<sup>TM</sup> RCS (58% of viable cells after 24 hours). A slight decrease in cell number was observed in wells treated with Biodentine<sup>TM</sup> but this was non-significant. (Fig 2)

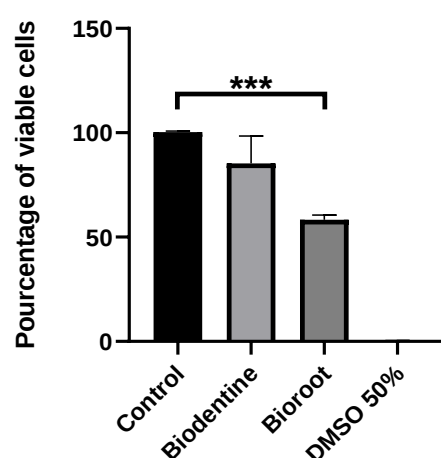


Figure 2: Representative graphic of CCK8 assay after M0 stimulation with Biodentine<sup>TM</sup> and Bioroot<sup>TM</sup> RCS.

### Bioroot<sup>TM</sup> RCS downregulate IL-1 $\beta$ mRNA expression in M0 macrophages

After 24 hours in presence of Biodentine<sup>TM</sup> or Bioroot RCS, RT-qPCR analysis showed a decrease in IL1-B mRNA expression whereas a slight increase in IL-6 and TNF-a mRNA was observed but this was not significant. No differences between control wells and Biodentine<sup>TM</sup> treated wells was observed (Fig 3).

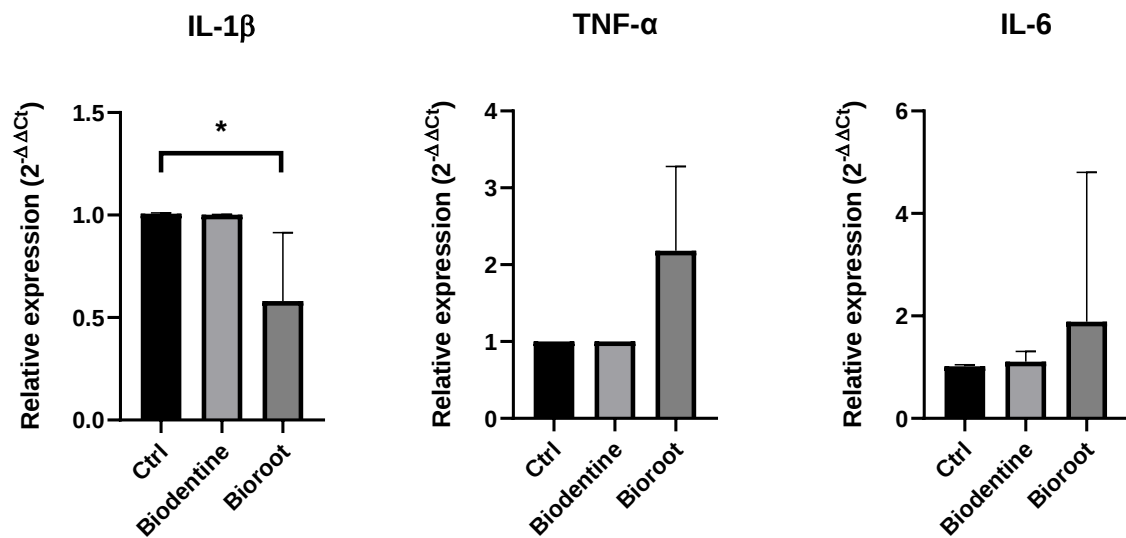


Figure 3: After 24 hours of M0 stimulation with Biodentine<sup>TM</sup> and Bioroot<sup>TM</sup> RCS, IL-1β, TNF-α and IL-6 gene expression were measured using RT-QPCR analysis.

## Bioroot<sup>TM</sup> RCS up-regulate IL-10mRNA expression in M0 macrophages

Regarding M2 macrophages markers, RT-qPCR analysis showed an increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10 expression after 24 hours of treatment. Also, CD206 and CD163 surface markers mRNA were downregulated in presence of Bioroot<sup>TM</sup> RCS. Biodentine<sup>TM</sup> had no influence on IL-10, CD206 and CD163 mRNA expression after 24 hours in culture (Fig 4).

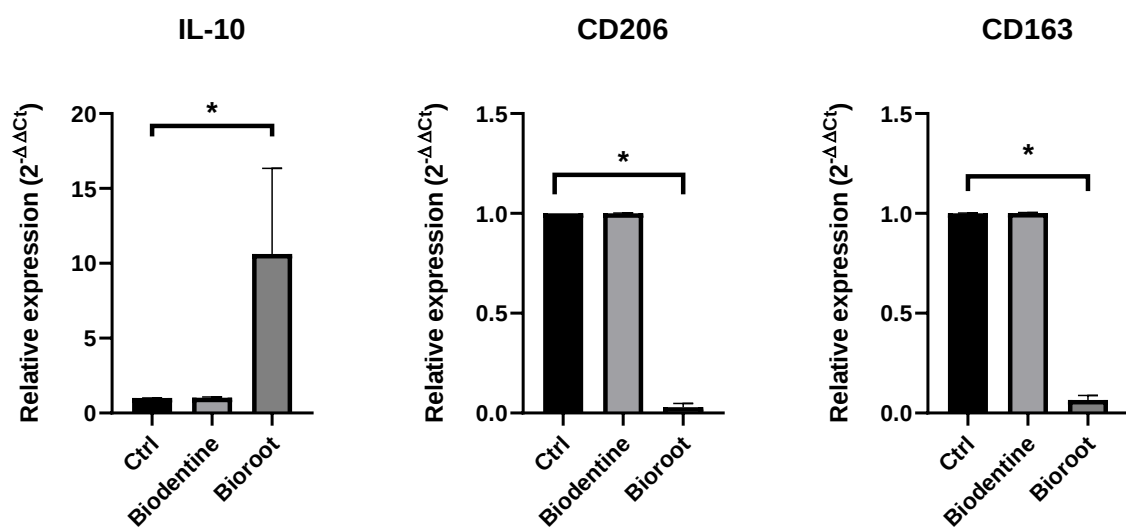


Figure 4: After 24 hours of M0 stimulation with Biodentine<sup>TM</sup> and Bioroot<sup>TM</sup> RCS, IL-10, CD206 and CD163 gene expression were measured using RT-QPCR analysis

## Bioroot™ RCS induce M1/M2 hybrid phenotype in-vitro

Next, we have measured pro and anti-inflammatory cytokines secretion using Luminex assay in the cell supernatants.

The concentration of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 did not change after stimulation with either Bioroot™ RCS or Biodentine™ (Fig 5).

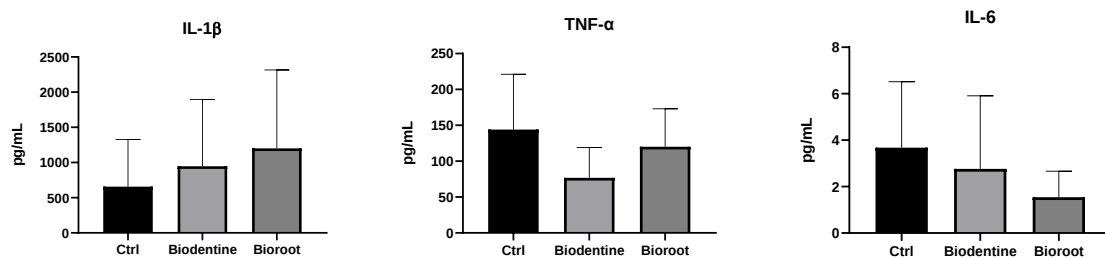


Figure 5: Representative graphics of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 protein concentration after stimulation with Biodentine™ or Bioroot™ RCS for 24 hours.

We observed a slight increase in IL-10 cytokine concentration after stimulation of M0 macrophages with Bioroot™ RCS but this was non-significant. We also observed a decrease in M2 macrophage marker Arginase after stimulation with Bioroot™ RCS whereas we did not observe any changes after Biodentine™ stimulation. However, Biodentine™ after 24h in presence of M0 macrophage increased the concentration of IL-1 receptor antagonist (IL1-RA) suggesting anti-inflammatory effect (Fig 6).

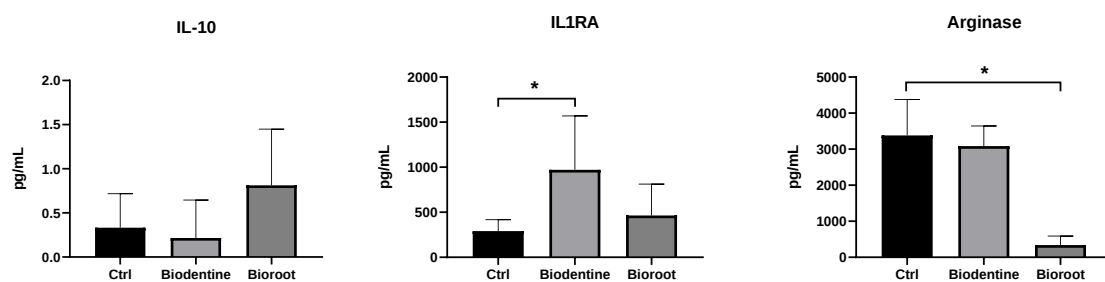


Figure 6: Representative graphics of IL-10, IL1RA and Arginase protein concentration after stimulation with Biodentine™ or Bioroot™ RCS for 24 hours.

## DISCUSSION

Les études visant à découvrir les effets des biomatériaux dentaires, en particulier les ciments HSC, sur les cellules immunitaires sont importantes afin d'améliorer l'efficacité et la sécurité des traitements proposés aux patients selon la situation clinique. Ces ciments grâce à leur propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires annoncées par les fabricants permettent d'envisager des traitements plus conservateurs et également assurer la pérennité des soins. De plus, la bioactivité de ces produits, c'est-à-dire leur capacité à induire une réponse tissulaire voulue par exemple la formation de cristaux d'hydroxyapatite permettant théoriquement une très bonne interface, est l'une des propriétés les plus désirée lors de leur utilisation. Afin d'aller encore plus loin et de permettre le développement de nouveaux biomatériaux, l'étude des propriétés anti-inflammatoires de ces ciments est une étape essentielle afin d'avoir des produits bioactifs les plus efficaces possible.

Dans cette étude *in vitro*, nous avons d'abord investigué l'effet cytotoxique potentiel de la Biodentine™ et du Bioroot™ RCS. Une des principales caractéristiques de ces biomatériaux est leur biocompatibilité. Après 24 heures de culture cellulaire, nous avons observé une diminution du nombre de cellules viables en présence du Bioroot™ RCS par rapport au contrôle. Cette diminution des cellules viables a également été rapportée par d'autres et peut être expliquée par la libération d'ions phosphate de calcium dans le milieu de notre modèle de culture cellulaire (1,16). Cependant, ce ciment de scellement reste moins cytotoxique par rapport aux anciennes générations de ciments résineux comme l'AH Plus longtemps considéré comme le gold standard (22–24). La libération d'hydroxyde de calcium augmente le pH du milieu jusqu'à 12 (données non montrées), ce qui entraîne une alcalinisation du milieu avant la stimulation des cellules. Cela suggère que ce changement drastique de pH induit la mort cellulaire après 24 heures de culture. Cette augmentation pourrait être expliquée par la haute solubilité du ciment dans le milieu de culture, solubilité qui expliquerait le dépôt de tissu minéralisé peu après l'obturation du canal radiculaire grâce au relargage important d'hydroxyde de calcium permettant une liaison calcium-phosphate dans les canaux radiculaires (8).

Nous avons également montré que le Bioroot™ RCS entraîne la polarisation des macrophages vers un phénotype "hybride" présentant les caractéristiques à la fois des macrophages de type M1 et M2. Ce phénotype hybride a été décrit lors de l'implantation de biomatériaux *in vivo* comme étant un nouveau sous-type de macrophages impliqué dans le rejet de greffe (25). Ces macrophages présentent des marqueurs classiques à la fois du sous type M1 et M2. Ils seraient impliqués dans la formation de matrice extracellulaire, et de néo angiogenèse entourant le biomatériau (14,26).

Les macrophages sont le principal type cellulaire à rencontrer des matériaux étrangers dans le corps humain et peuvent moduler la réponse inflammatoire, de l'inflammation aiguë à sa résolution, grâce à une grande plasticité et des phénotypes multiples (9,12). Cette plasticité est toujours étudiée à l'heure actuelle grâce à l'essor des études sur les dispositifs médicaux implantables en particulier sur la gestion de l'inflammation afin de permettre la pérennité du matériau *in vivo*. De plus, nous avons constaté que l'expression de l'ARNm de l'IL-10 était augmentée et que celles du CD163 et du CD206 (marqueurs des macrophages M2) étaient

diminués. Ces résultats sont en corrélation avec la seule étude sur l'effet du Bioroot™ RCS sur les macrophages *in vitro* ayant obtenus des résultats similaires (2).

La Biodentine™ a été décrite comme favorisant la cicatrisation des plaies pulpaires lors de thérapeutiques de vitalité pulpaire, notamment en induisant la libération de cytokines pro et anti-inflammatoires telles que le TGF-β1, l'IL-10, les PGE2 par les cellules résidentes (13). Elle permet de conserver la vitalité pulpaire induisant ainsi la formation d'une dentine tertiaire, en particulier chez les jeunes patients (14). Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons remarqué aucun effet de la Biodentine™ mis en présence de macrophages M0 dérivés de la lignée cellulaire THP-1. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que la Biodentine™ peut affecter les cellules inflammatoires au stade précoce de l'inflammation (c'est-à-dire avant 24 heures) cependant aucune étude à l'heure actuelle ne permet de confirmer cette hypothèse. De plus, la Biodentine™ pourrait avoir un effet anti-inflammatoire sur des macrophages qui ont déjà été activés par des composants bactériens tels que le LPS ou la libération d'oxyde nitrique agissant ainsi sur des cellules immunitaires déjà activées.

En effet, lors d'une carie dentaire, les bactéries libèrent des composants pro-inflammatoires qui stimulent les cellules de la pulpe dentaire pour favoriser une réaction inflammatoire. Si cette inflammation persiste elle va conduire à une inflammation chronique et *in fine* à la nécrose des cellules pulpaires (15). Dans nos conditions, nous avons décidé d'étudier l'effet de la Biodentine™ sur des macrophages naïfs qui n'ont jamais rencontré de signal inflammatoire ou de composants bactériens. Le seul résultat de cette étude a été une augmentation de la concentration d'IL1-RA après 24 heures, qui pourrait être un reliquat d'une stimulation plus précoce (avant 24 heures). Il serait intéressant d'étudier l'effet de ce biomatériau sur les macrophages M0 au cours d'une courbe cinétique afin de déterminer si des propriétés anti-inflammatoires apparaissent avant 24 heures.

L'utilisation en pratique dentaire quotidienne des ciments HSC tels que la Biodentine™ et le Bioroot™ RCS a gagné en intérêt au cours de la dernière décennie, cependant de plus amples recherches sur la bioactivité de ces ciments sont nécessaires afin d'élargir leurs champs d'application et permettre par la suite le développement de nouveaux produits plus efficaces dans des situations cliniques spécifiques.

## DISCUSSION

Studies aimed at discovering the effects of dental biomaterials, in particular HSC cements, on immune cells are important in order to improve the efficacy and safety of treatments offered to patients depending on the clinical situation. These cements, thanks to their antibacterial and anti-inflammatory properties announced by the manufacturers, make it possible to envisage more conservative treatments and also ensure the durability of the care. Moreover, the bioactivity of these products, i.e. their capacity to induce a desired tissue response, for example the formation of hydroxyapatite crystals theoretically allowing a very good interface, is one of the most desired properties when using them. In order to go further and allow the development of new biomaterials, the study of the anti-inflammatory properties of these cements is an essential step in order to have the most efficient bioactive products possible.

In this in-vitro study, we first investigated the potential cytotoxic effect of Biodentine™ and Bioroot™ RCS. One of the main characteristics of these biomaterials is their biocompatibility. After 24 hours of cell culture, we observed a decrease in the number of viable cells in the presence of Bioroot™ RCS compared to the control. This decrease in viable cells has also been reported by others and can be explained by the release of calcium phosphate ions into the medium of our cell culture model (1,16). However, these sealers remains less cytotoxic compared to older generations of resin sealer such as HA Plus which has long been considered the gold standard (22,26,27). The release of calcium hydroxide increases the pH of the medium up to 12 (data not shown), resulting in an alkalisation of the medium prior to cell stimulation. This suggests that this drastic change in pH induces cell death after 24 hours of culture. This increase could be explained by the high solubility of the cement in the culture medium, which would explain the deposition of mineralized tissue shortly after root canal obturation due to the significant release of calcium hydroxide allowing calcium-phosphate binding in the root canals (6).

We have also shown that Bioroot™ RCS leads to the polarization of macrophages towards a "hybrid" phenotype with characteristics of both M1 and M2 macrophages. This hybrid phenotype has been described in biomaterial implantation in vivo as a new subtype of macrophages involved in graft rejection (28). These macrophages show classical markers of both the M1 and M2 subtypes. They are thought to be involved in the formation of extracellular matrix, and neo angiogenesis surrounding the biomaterial (12,29).

Macrophages are the main cell type to encounter foreign materials in the human body and can modulate the inflammatory response, from acute inflammation to its resolution, through great plasticity and multiple phenotypes (9,12). This plasticity is still being investigated today with the rise of implantable medical device studies in particular on the management of inflammation to allow for the sustainability of the material *in vivo*. In addition, we found that IL-10 mRNA expression was increased and CD163 and CD206 (M2 macrophage markers) expression was decreased. These results correlate with the only study on the effect of Bioroot™ RCS on macrophages in-vitro that obtained similar results (2).

Biodentine™ has been described to promote pulp wound healing in pulp vitality therapy, notably by inducing the release of pro- and anti-inflammatory cytokines such as TGF-β1, IL-10, PGE2 from resident cells (13). It allows pulp vitality to be maintained, thus inducing the formation of tertiary dentin, particularly in young patients (14). Under our experimental conditions, we did not notice any effect of Biodentine™ in the presence of M0 macrophages derived from the THP-1 cell line. This result could be explained by the fact that Biodentine™

can affect inflammatory cells at the early stage of inflammation (i.e. before 24 hours), but there are currently no studies to confirm this hypothesis. Furthermore, Biodentine™ could have an anti-inflammatory effect on macrophages that have already been activated by bacterial components such as LPS or nitric oxide release, thus acting on already activated immune cells.

In fact, during dental caries, the bacteria release pro-inflammatory components which stimulate the cells of the dental pulp to promote an inflammatory reaction. If this inflammation persists it will lead to chronic inflammation and ultimately to pulp cell necrosis (15). Under our conditions, we decided to study the effect of Biodentine™ on naive macrophages that had never encountered an inflammatory signal or bacterial components. The only result of this study was an increase in IL1-RA concentration after 24 hours, which could be a remnant of earlier stimulation (before 24 hours). It would be interesting to study the effect of this biomaterial on M0 macrophages in a kinetic curve to determine whether anti-inflammatory properties appear before 24 hours.

The use of HSC cements such as Biodentine™ and Bioroot™ RCS in daily dental practice has gained interest over the last decade, however further research into the bioactivity of these cements is needed to broaden their application and subsequently allow the development of new, more effective products in specific clinical situations.

## CONCLUSION

Despite a similar chemical composition, with similar active ingredients but different adjuvants, Biodentine™ and Bioroot™ RCS show different characteristics, especially on naïve macrophages. Biodentine™ seems to have no effect on M0 macrophages whereas Bioroot™ RCS promotes cell polarization towards an "hybrid" M1/M2 phenotype. Further research is needed to determine whether this polarization is effective *in vivo* and improves the resolution of inflammation after bacterial contamination.

Malgré une composition chimique proche, avec des principes actifs similaires mais des adjuvants différents, la Biodentine™ et le Bioroot™ RCS présentent des caractéristiques différentes notamment sur les macrophages naïfs. La Biodentine™ semble n'avoir aucun effet sur les macrophages M0 alors que le Bioroot™ RCS favorise la polarisation cellulaire vers un phénotype "hybride" M1/M2. Des recherches supplémentaires devraient être nécessaires pour déterminer si cette polarisation est efficace *in vivo* et améliore la résolution de l'inflammation après une contamination bactérienne.

## REFERENCES

1. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. J Endod [Internet]. 1993 [cited 2022 Jul 1];19(12):591–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239906802712?via%3Dihub>
2. Zapf AM, Chedella SCV, Berzins DW. Effect of additives on mineral trioxide aggregate setting reaction product formation. J Endod [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Jul 1];41(1):88–91. Available from: <http://www.jendodon.com/article/S0099239914006566/fulltext> OK
3. Duarte MAH, Marciano MA, Vivan RR, Tanomaru Filho M, Tanomaru JMG, Camilleri J. Tricalcium silicate-based cements : properties and modifications. Braz Oral Res [Internet]. 2018 Oct 18 [cited 2022 Jun 8];32:111–8. Available from: <http://www.scielo.br/j/bor/a/yx47qhMWgNcFYV4XYsJnthM/?lang=en> OK
4. Hiremath GS, Kulkarni RD, Naik BD. Evaluation of minimal inhibitory concentration of two new materials using tube dilution method: an in vitro study. J Conserv Dent [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2022 Jun 8];18(2):159. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879875/>
5. Razieh Hoseinifar DMs, Ali Eskandarizadeh DMs, Masoud Parirokh DMs, Molook Torabi DMs, Fereshteh Safarian DMs, Elina Rahmanian DMs. Histological evaluation of human pulp response to direct pulp capping with MTA, CEM Cement, and Biodentine. J Dent [Internet]. 2020 Sep [cited 2022 May 19];21(3):177. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7519940/>
6. Arandi, Naji Ziad, and Mohammad Thabet. “Minimal Intervention in Dentistry: A Literature Review on Biodentine as a Bioactive Pulp Capping Material.” BioMed research international vol. 2021 5569313. 3 Apr. 2021, doi:10.1155/2021/5569313 Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8041541/>
7. Niranjani K, Prasad MG, Vasa AAK, Divya G, Thakur MS, Saujanya K. Clinical evaluation of success of primary teeth pulpotomy using mineral trioxide aggregate(®), laser and Biodentine(TM)- an in vivo study. J Clin Diagn Res [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Jun 8];9(4):35–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4437156/>
8. Colombo M, Poggio C, Dagna A, Meravini MV, Riva P, Trovati F, et al. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. J Clin Exp Dent [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 May 19];10(2):e120. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5899788/>
9. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol [Internet]. 2010 May [cited 2022 Jun 20];11(5):373–84. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.1863>
10. Kourtzelis I, Hajishengallis G, Chavakis T. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. Front Immunol. 2020 ;11 :553. Published 2020 Mar 31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7137555/>
11. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response

- Mechanisms of the Dentine–Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 May 25];22(3):1–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7867227/>
12. Farges J-C, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. 2015 [cited 2022 Jun 8]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/230251> OK
  13. Julier Z, Park AJ, Briquez PS, Martino MM. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomater* 2017 Apr 15;53:13–28. OK
  14. Witherel CE, Ababayehu D, Barker TH, Spiller KL. Macrophage and fibroblast interactions in biomaterial-mediated fibrosis [Internet]. Vol. 8, *Advanced Healthcare Materials*. NIH Public Access; 2019 [cited 2022 May 23]. p. e1801451. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6415913/>
  15. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2022 May 25];20(2):86. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2327202/>
  16. Kou PM, Babensee JE. Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *J Biomed Mater Res Part A* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2022 May 25];96A(1):239–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.a.32971> OK
  17. Loison-Robert LS, Tassin M, Bonte E, Berbar T, Isaac J, Berdal A, et al. In vitro effects of two silicate-based materials, Biodentine and BioRoot RCS, on dental pulp stem cells in models of reactionary and reparative dentinogenesis. *PLoS One* 2018;13(1):1–19. OK
  18. Youssef AR, Emara R, Taher MM, Al-Allaf FA, Almalki M, Almasri MA, et al. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health*. 2019 Jul 2;19(1): 133
  19. Da Silva RAB, Da Silva LAB, Gabriel-Junior EA, Sorgi CA, Faccioli LH, Massoni VV, et al. M1 and M2 macrophages phenotypes modulation after stimuli with materials used in endodontic treatment. *Braz Dent J* 2021;32(3):32–43. OK
  20. Braga JM, Oliveira RR, de Castro Martins R, Vieira LQ, Sobrinho APR. Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. *Dent Traumatol* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Jun 8];31(5):390–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/edt.12190>
  21. ISO. Evaluation Biologique et clinique des dispositifs médicaux. 2021;(5):22. Available from: <https://www.iso.org/fr/standard/75769.html> OK
  22. Lee JK, Kwak SW, Ha JH, Lee WC, Kim HC. Physicochemical properties of epoxy resin-based and bioceramic-based root canal sealers. *Bioinorg Chem Appl* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jun 14];2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292198/>
  23. Lim M, Jung C, Shin D-H, Cho Y, Song M. Calcium silicate-based root canal sealers: a literature review. *Restor Dent Endod* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 14];45(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7431927/>

24. Abdul M, Murali N, Rai P, Mirza M, Salim S, Aparna M, et al. Clinico-histological evaluation of dentino-pulpal complex of direct pulp capping agents: a clinical study. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 May 25];13(Suppl 1):S194. Available from: [/pmc/articles/PMC8375854/](#) NON : adresse URL incomplète
25. Yu T, Wang W, Nassiri S, Kwan T, Dang C, Liu W, et al. Temporal and spatial distribution of macrophage phenotype markers in the foreign body response to glutaraldehyde-crosslinked gelatinhydrogels. *J Biomater Sci Polym Ed* [Internet]. 2016 May 23 [cited 2022 Jul 1];27(8):721. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8375854/>
26. Spiller KL, Nassiri S, Witherel CE, Anfang RR, Ng J, Nakazawa KR, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Jun 9];37:194. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312192/>

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Figure 1: Biodentine™ and Bioroot™ RCS were put in silicone mold for 24 hours to set (a). After setting cements were cultured in RPMI1640 medium to obtain conditioned media before cell experiment. M0c: Control, BD: Biodentine™, BR: Bioroot™ RCS (b).</i> | 14 |
| <i>Figure 2: Representative graphic of CCK8 assay after M0 stimulation with Biodentine™ and Bioroot™ RCS.</i>                                                                                                                                                    | 17 |
| <i>Figure 3: After 24 hours of M0 stimulation with Biodentine™ and Bioroot™ RCS, IL-1<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math> and IL-6 gene expression were measured using RT-QPCR analysis.</i>                                                              | 18 |
| <i>Figure 4: After 24 hours of M0 stimulation with Biodentine™ and Bioroot™ RCS, IL-10, CD206 and CD163 gene expression were measured using RT-QPCR analysis</i>                                                                                                 | 18 |
| <i>Figure 5: Representative graphics of IL-1<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math> and IL-6 rprotein concentration after stimulation with Biodentine™ or Bioroot for 24 hours.</i>                                                                          | 19 |
| <i>Figure 6: Representative graphics of IL-10, Arginase and IL1RA protein concentration after stimulation with Biodentine™ or Bioroot for 24 hours.</i>                                                                                                          | 19 |

## LISTE DES TABLES

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| <i>Table 1: Primers sequences used for RT-qPCR analysis</i> | 15 |
|-------------------------------------------------------------|----|

## LISTE DES ABREVIATIONS

MTA : mineral trioxyde aggregate  
HSC : ciments hydrauliques silicate de calcium  
PMA: Phorbol-12-myristate-13-acetate  
TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
IL-1 $\beta$  : Interleukin 1 $\beta$

NANTES UNIVERSITÉ  
UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE

---

Vu le Président du Jury,

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Vu le Doyen,

Pr Assem SOUEIDAN

**LAPERINE (Olivier).** – Etude comparative de différents ciments silicate de calcium sur la polarisation des macrophages. 29 f. ; ill. ; tabl. ; 26 ref. ; 30 cm (Thèse Chir. Dent. ; Nantes ; 2022)

**RÉSUMÉ :**

Les matériaux à base de silicate de calcium tels que la Biodentine™ ou plus récemment le Bioroot™ RCS présentent un large éventail d'applications en chirurgie dentaire tout en respectant le gradient thérapeutique. Ces deux biomatériaux présentent des propriétés anti-microbiennes et anti-inflammatoires annoncées par les fabricants. Cependant, peu d'études se sont intéressées à leur rôle précis sur la régulation de l'inflammation.

L'objectif de cette thèse d'exercice a été d'évaluer la capacité de la Biodentine™ et du Bioroot™ RCS à influencer la polarisation des macrophages naïfs *in vitro*.

Un protocole expérimental a été réalisé en cultivant des macrophages naïfs issus d'une lignée cellulaire de monocytes humains en présence de milieux de culture conditionnés avec les éluats des ciments Biodentine™ et Bioroot™ RCS pendant 24 heures.

L'étude de l'expression génique et protéique de plusieurs marqueurs de l'inflammation a été réalisée par analyse RT-qPCR et Legend Plex.

Les résultats de cette étude montrent que le Bioroot™ RCS permet de polariser des macrophages naïfs vers un phénotype dit « hybride » présentant des caractéristiques à la fois pro et anti-inflammatoires alors que la Biodentine™ ne permet pas cette polarisation.

Cette étude montre la nécessité de continuer les recherches sur la bioactivité de ces produits afin d'élargir leur champ d'application et permettre le développement de nouveaux produits plus efficace dans des situations cliniques spécifiques.

**RUBRIQUE DE CLASSEMENT :** Odontologie Conservatrice

**MOTS CLÉS MESH :**

Ciments dentaires – Dental cements

Silicate de tricalcium – Tricalcium silicate

Macrophages - Macrophages

Matériaux biocompatibles – Biocompatible materials

Traitement conservateur - Conservative Treatment

**JURY**

Président : Pr. Fabienne Pérez

Assesseur : Pr. Philippe Lesclous

Assesseur : Dr. Cécile Dupas

Directeur : Dr. Alexis Gaudin