

UNIVERSITÉ DE NANTES
UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE

Année : 2007 – 2008.

N°:37

DONNEES RECENTES SUR LA DENTINOGENESE DE REPARATION

THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

présentée

et soutenue publiquement par

Mademoiselle **BARBOTTIN** **Andréa**

née le 24 Mai 1982.

.devant le jury ci-dessous

Président : Monsieur le Professeur Olivier LABOUX

Assesseur : Madame le Docteur Brigitte ALLIOT-LICHT

Assesseur : Monsieur le Docteur Dominique MARION

Assesseur : Madame le Docteur Sylvie DAJEAN-TRUTAUD

Directeur de thèse : Madame le Docteur Brigitte ALLIOT-LICHT

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION..	6
II. LE COMPLEXE PULPODENTINAIRE.....	7
II.1. La pulpe.....	7
II.1.1. Description générale.....	7
II.1.2. La région dentinogénétique.....	7
II.1.2.1. Les odontoblastes.....	8
II.1.2.1.1. Description.....	8
II.1.2.1.2. Fonction de sécrétion.....	10
II.1.2.1.3. Fonction immunitaire.....	14
II.1.2.1.4. Fonction sensorielle.....	14
II.1.2.2 Les cellules de la couche sous odontoblastique de Höhl.....	15
II.1.3. Les cellules de la pulpe centrale.....	16
II.1.3.1. Les fibroblastes.....	16
II.1.3.2 Les cellules mésenchymateuses indifférenciées.....	16
II.1.3.3 Les cellules immunocompétentes.....	17
II.1.4. La matrice extracellulaire.....	17
II.1.5. Innervation et vascularisation.....	18
II.2. La dentine.....	19
II.2.1. Description générale.....	19
II.2.2 Les différents types de dentine.....	20
II.2.2.1. La prédentine.....	20

II.2.2.2. La mantle dentine.	20
II.2.2.3. La dentine primaire.....	21
II.2.2.4. La dentine secondaire.	21
II.2.2.5. La dentine tertiaire.....	22
<i>II.2.2.5.1. La dentine réactionnelle.....</i>	<i>23</i>
<i>II.2.2.5.2. La dentine de réparation.....</i>	<i>23</i>
III. THERAPEUTIQUES ACTUELLES.....	27
III.1. Le coiffage direct.	27
III.1.1. Définition.....	27
III.1.2 Indications.....	27
III.1.3. Contre-indications.	29
III.2. Protocole opératoire.	30
III.2.1. Anesthésie.....	30
III.2.2. Pose de la digue.....	30
III.2.3. Curetage dentinaire.	30
III.2.4. Contrôle hémorragique et désinfection cavitaire.	31
III.2.5. Produit de coiffage.	33
III.2.5.1. L'hydroxyde de calcium.	33
III.2.5.2. Le Mineral Trioxyde Aggregate.....	36
III.2.5.3. Les résines adhésives.....	39
III.2.6. Pose du matériau d'obturation coronaire.	43
IV. LE PROCESSUS DE REPARATION DENTINAIRE (DONNEES RECENTES).	45
IV.1. Les cellules potentiellement responsables de la formation de dentine de réparation. .45	

IV.1.1. Généralités sur les cellules souches.	45
IV.1.2. Les cellules souches de la pulpe dentaire.	48
IV.1.2.1. Isolation des cellules souches de la pulpe dentaire.	49
<i>IV.1.2.1.1. Isolation des cellules souches de la pulpe dentaire par protocole d'immuno-sélection.</i>	49
<i>IV.1.2.1.2. Isolation des cellules souches de la pulpe dentaire à l'aide d'un colorant lié à l'ADN.</i>	52
IV.1.2.2. Capacité de différenciation des cellules souches de la pulpe dentaire.	53
IV.1.3. Diversité de la réponse réparatrice.	55
IV.2. Le processus de réparation et ses analogies avec les premières étapes de formation de la dent.	56
IV.2.1. La différenciation des odontoblastes lors du développement dentaire.	57
IV.2.2. Les signaux influençant le recrutement et la différenciation des cellules pulpaires pendant la dentinogénèse de réparation.	59
IV.3. Les perspectives thérapeutiques.	61
V. THERAPEUTIQUES PULPAIRES DE DEMAIN.	62
V. 1. Ingénierie tissulaire.	62
V.1.1. Définition.	62
V.1.2. Les moyens.	63
V.1.2.1. Les cellules souches.	63
V.1.2.2. Les vecteurs.	63
V.1.2.3. Les molécules bioactives.	64
V.1.3. Les techniques.	65
V.2. Techniques in vivo.	66
V.2.1. Application directe de molécules bioactives.	66
V.2.1.1. Application directe de facteurs de croissance.	66

V.2.1.1.1. <i>Rappels sur les facteurs de croissance</i>	66
V.2.1.1.2. <i>Application de TGF β1</i>	67
V.2.1.1.3. <i>Application de Bone Morphogenetic Protein-7(Osteogenic protein-1)</i>	70
V.2.2.2. <i>Application directe de protéines de la matrice extracellulaire dentinaire</i>	72
V.2.2.2.1. <i>Application de la sialoprotéine osseuse (la BSP)</i>	72
V.2.2.2.2. <i>Application de Dentonin, fragment de la MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein)</i>	75
V.2.2.2.3. <i>Application d'agents inducteurs de la chondrogénèse (CIA)</i>	78
V.2.2.2.4. <i>Application de l' Enamel Matrix Derivative (EMD)</i>	82
V.2.2. <i>Thérapie génique in vivo</i>	87
V.2.3. <i>Synthèse</i>	88
V.3. <i>Techniques ex vivo</i>	89
V.3.1. <i>Induction odontoblastique par application directe de BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2)</i>	89
V.3.2. <i>Induction odontoblastique par transfection du gène du morphogène</i>	92
V.3.2.1. <i>Induction odontoblastique par transfection du gène de la BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein-7)</i>	92
V.3.2.2. <i>Induction odontoblastique par transfection du gène de la BMP-11</i>	93
V.3.3. <i>Synthèse</i>	95
VI. <i>CONCLUSION</i>	96

I. INTRODUCTION.

La pulpe dentaire est dotée de fonctions essentielles à la pérennité de l'organe dentaire. Elle permet ainsi l'innervation et la nutrition de la dent, la dentinogenèse et l'apexogenèse. Suite à une agression provenant de la cavité buccale, la pulpe synthétise un tissu minéralisé qui la protège appelé dentine tertiaire.

Cette dentine tertiaire comprend deux types de dentine : la dentine réactionnelle qui est sécrétée quand l'agression pulpaire a préservé la barrière odontoblastique et la dentine de réparation, sujet de notre thèse, qui est produite quand les odontoblastes sont détruits suite à une agression trop importante.

La dentinogenèse de réparation permet la sécrétion d'une matrice minéralisée, véritable barrière à l'invasion bactérienne buccale tout en préservant la vitalité dentaire.

L'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en œuvre pendant la dentinogenèse de réparation ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

En effet, la régénération d'une dent entière n'est elle pas un rêve pour le futur ?

Notre thèse a pour but de décrire les mécanismes connus actuellement pour permettre la formation de la dentine de réparation et quels peuvent être les moyens d'obtenir dans un plus grand nombre d'indications la formation d'une matrice minéralisée lors de l'exposition pulpaire.

Dans une première partie, nous décrirons le complexe pulpodentinaire, puis nous exposerons les thérapeutiques actuelles utilisées pour obtenir de la dentine réparatrice.

Les deux parties suivantes seront centrées sur les données récentes sur le processus de réparation, avec dans un premier temps la description des événements cellulaires et

moléculaires lors du processus de réparation puis les approches expérimentales sur les thérapeutiques pulpaires de demain.

II. LE COMPLEXE PULPODENTINAIRE.

II.1. LA PULPE.

II.1.1. DESCRIPTION GENERALE.

La pulpe dentaire est un tissu conjonctif lâche logé au centre de la dent, richement innervée et vascularisée. C'est un tissu hautement spécialisé.

Ses fonctions principales sont la formation de dentine par les odontoblastes, la transmission neurosensorielle d'informations sensibles, le maintien de la structure du tissu pulpaire.

Elle est capable de synthétiser de la dentine de réparation sous certaines conditions physiologiques et pathologiques (AURIOL *et al.*, 2000).

Elle est composée de 75% d'eau et de 25% de matière organique.

Elle comprend des cellules comprises dans la région dentinogénétique : les odontoblastes et les cellules de la couche sous odontoblastique de Höhl ; ainsi que des cellules de la pulpe centrale et une matrice extracellulaire.

II.1.2. LA REGION DENTINOGENETIQUE.

Notons que la région dentinogénétique est éliminée lors d'une effraction pulpaire.

II.1.2.1. LES ODONTOBLASTES.

II.1.2.1.1. Description.

Les odontoblastes sont des cellules hautement différenciées disposées en une assise continue en périphérie de la pulpe.

Elles dérivent de cellules mésenchymateuses provenant de la crête neurale.

Ce sont des cellules postmitotiques qui sont donc incapables de se diviser.

Elles présentent un corps cellulaire situé dans la pulpe et un prolongement cytoplasmique à l'intérieur des tubuli dentinaires (AURIOL *et al.*, 2000).

Le corps cellulaire odontoblastique est haut de 20 à 40 μ m, et large de 3 μ m. Au tiers basal, on note la présence d'un réticulum endoplasmique granulaire (REG) fortement développé, d'un noyau avec un nucléole bien marqué. La zone médiane contient un appareil de Golgi avec plusieurs dictyosomes situés dans la partie centrale, tandis que les parties latérales sont occupées par les citernes du REG allongées selon le grand axe de la cellule, au contraire des citernes des dictyosomes qui ne sont pas orientées. Dans cette région centrale, des lysosomes et des corps multivésiculaires sont aussi présents. Les corps cellulaires sont réunis dans leur partie distale par des complexes de jonction de type desmosome et par des jonctions communicantes (*gap junctions*), avec de la connexine 43 comme molécule associée (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Le prolongement odontoblastique est constitué d'un tronc principal et de nombreuses branches latérales. Il est limité par une membrane plasmique et contient les composants du cytosquelette de la cellule : la vimentine, l'actine et la nestine ; trois filaments intermédiaires importants pour l'organisation et la fonction des cellules et des tissus (GOLDBERG et SMITH, 2004).

Les odontoblastes sont de forme oblongue et forment une palissade étanche (Figure 1 et Figure 2).

Les odontoblastes ont une fonction de dentinogénèse. Ils forment de la dentine durant toute la vie et pendant les processus de réparation. La production continue de dentine se fait au détriment du volume pulpaire. De plus, les odontoblastes joueraient un rôle dans les processus d'immunité ainsi que dans la transmission sensorielle.

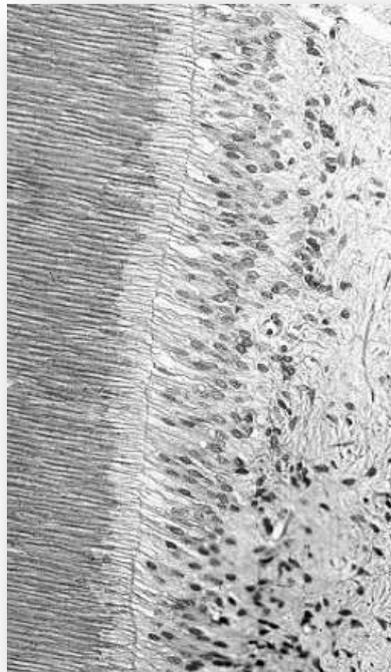


Figure 1 : Coupe décalcifiée colorée de la palissade odontoblastique.

(D'après B.ALLIOT-LICHT)

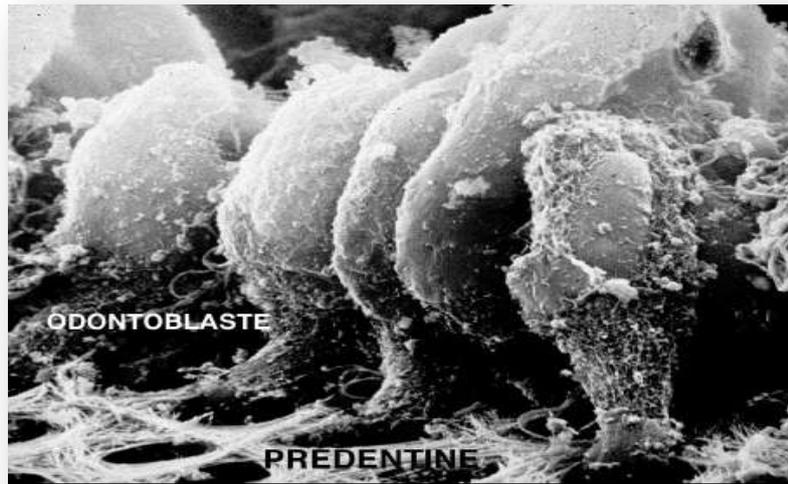


Figure 2 : Odontoblastes en microscopie électronique à balayage.

(D'après A. Jean et D. Marion)

II.1.2.1.2. Fonction de sécrétion.

L'odontoblaste synthétise et secrète le collagène dentinaire ainsi que les protéines non collagéniques de la matrice extracellulaire.

La dentinogénèse est un processus continu et l'on estime que les odontoblastes élaborent 4 μ m de nouvelle dentine par jour (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Le rythme de la dentinogénèse se fait selon trois fronts de sécrétion.

Dans un premier temps, l'odontoblaste synthétise la prédentine en surface à la jonction entre son corps cellulaire et son prolongement (numéro 1 de la figure 3).

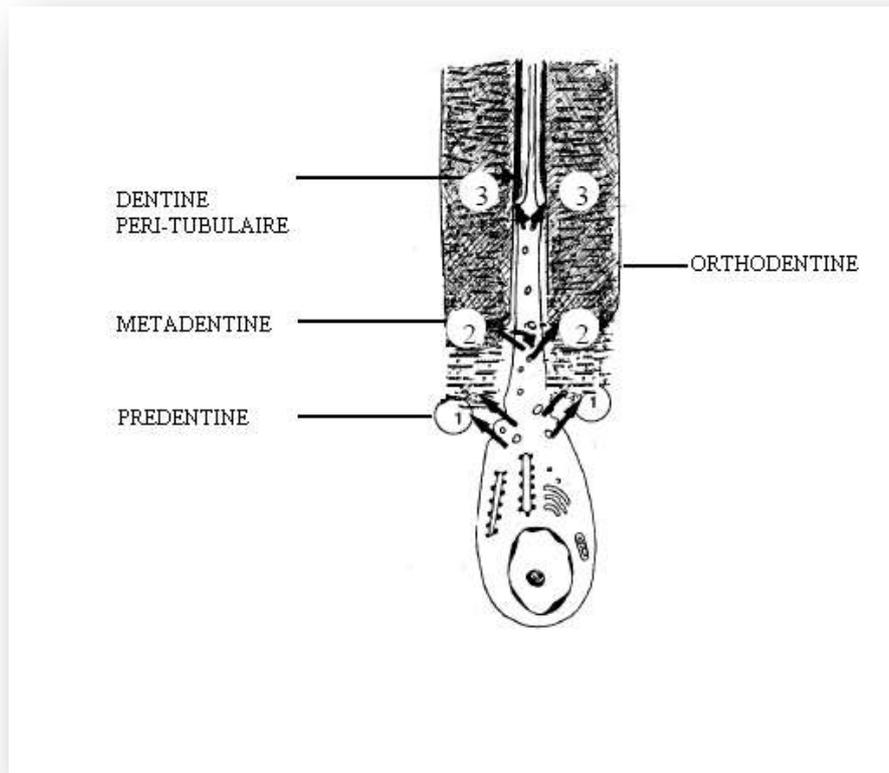


Figure 3: Sites de sécrétion.

(D'après B.ALLIOT-LICHT)

La pré-dentine est composée de 97% de collagène de type I (dont 10-15% de trimère) et de 3% de type V [$\alpha 1(V)$ et $\alpha 3(V)$]. Des phospholipides, de l'albumine et des protéoglycanes ont également été identifiés ainsi que de très petites quantités de phosphoprotéines. La pré-dentine contient du calcium (0,4%) et du phosphore (0,37%) à l'état de trace (PIETTE ET GOLDBERG, 2001).

Les fibrilles de la pré-dentine sont parallèles les unes aux autres. Il apparaît que les fibrilles sécrétées juste au voisinage des corps cellulaires subissent des processus d'agrégation extracellulaire et migrent vers la zone où la minéralisation va se produire. Cette double fonction biologique est assumée par les GAGs (glyco-amino-glycanes), qui sont la décorine et le biglycan assumant des fonctions dans les processus de maturation du collagène.

La ligne festonnée entre la prédentine (numéro 1 de la figure 3) et l'orthodentine traduit la précipitation d'éléments minéraux sous la forme de paillettes ou d'aiguilles, à la surface ou dans les espaces disponibles du collagène dentinaire (PIETTE et GOLDBERG, 2001). Longtemps, le terme de front de minéralisation a été appliqué. Cette bordure est maintenant nommée la métadentine (numéro 2 de la figure 3)

Les odontoblastes synthétisent au niveau de la métadentine (numéro 2 de la figure 3) des protéines non collagéniques (10% de la phase organique matricielle).

Parmi ces protéines non collagéniques, les SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins*) comprennent :

- la DSP (la sialoprotéine dentinaire).
- la DPP (la phosphoprotéine dentinaire)
- la DMP-1 (*dentin matrix protein-1*),
- l'OPN (l'ostéopontine),
- la BSP (la bone sialoprotéine)
- la MEPE (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*) ou OF45.

Ces protéines sont codées au niveau de la même région chromosomique 4q21 car elles ont des caractères communs. Ces protéines présentent des motifs d'interaction avec l'hydroxyapatite et sont donc impliquées dans les phénomènes de minéralisation. D'autre part, elles présentent un motif RGD (arginine-glycine-aspartate), majeur dans l'interaction cellulaire (GOLDBERG *et al.*, 2003).

La DSP et la DPP ont longtemps été considérées comme des molécules exprimées exclusivement par les odontoblastes, et par conséquent comme des marqueurs phénotypiques du type odontoblastique. La DSP et la DPP sont produites par le clivage d'un précurseur

protéique commun. Ce dernier est codé par un seul gène nommé sialophosphoprotéine dentinaire (DSPP) (MACDOUGALL *et al.*, 1997). Or, le gène DSPP est aussi exprimé par les ostéoblastes mais en moindre proportion dans un ratio de 1:400. La DSP et la DPP sont donc non spécifiques de l'odontoblaste (QIN *et al.*, 2002).

La liste de ces nombreuses molécules et le manque de spécificité de chacune d'entre elles montre que pour l'identification des cellules présumées être de la lignée odontoblastique un riche panel de marqueurs doit être pris en considération (GOLDBERG et SMITH, 2004).

Au niveau de la métadentine, l'odontoblaste secrète aussi d'autres protéines non collagéniques : l'ostéocalcine, l'ostéonectine et la sialoprotéine osseuse II (BSP II) ainsi que des protéoglycanes riches en chondroïtines-sulfate : biglycannes et décorine et riches en kératane-sulfate : lumican et fibromoduline.

Des enzymes sont aussi synthétisées : les métalloprotéases : la métalloprotéase-2 (gélatinase A), la MMP-9, la MMP-3.

Une amélogénine de 7kDa a été identifiée (NEBGEN *et al.*, 1999). Cette molécule nommée CIA (*Chondrogenic-Inducing Agent*) résulterait d'un épissage alternatif d'amélogénine et serait exprimée par les odontoblastes. Cette molécule aurait le potentiel d'induire la minéralisation quand elle est implantée dans la pulpe, ce que nous décrirons plus loin.

La pré-dentine est donc transformée en dentine grâce aux protéines de la métadentine. Cette dentine est nommée dentine intercanaliculaire.

Il existe un troisième site de sécrétion visible sur la figure 3 (numéro 3) : c'est le site de sécrétion de la dentine péricanaliculaire ou péricanaliculaire. Chez l'homme, l'épaisseur de la dentine péricanaliculaire ne dépasse pas 0,5 à 1,5µm. Par ailleurs, sa structure

hyperminéralisée résiste mieux à l'abrasion que la dentine intercanaliculaire (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

II.1.2.1.3. Fonction immunitaire.

Lors du processus carieux, les odontoblastes sont les premières cellules qui rencontrent les signaux bactériens. Dans une étude récente, il a été montré que les odontoblastes permettraient le recrutement de cellules dendritiques en sécrétant des cytokines attractives suite au contact avec le LTA (*lipoteichoic acid*) bactérien (DURAND *et al.*, 2006).

II.1.2.1.4. Fonction sensorielle.

L'existence d'un cil primaire au voisinage de la zone golgienne de l'odontoblaste a été mise en évidence. Le cil est un organite unique, immobile, présent dans la plupart des cellules des vertébrés. La fonctionnalité du cil odontoblastique pourrait jouer un rôle dans la transduction de signaux extracellulaires (rôle mécanosenseur) permettant de contrôler la réponse au stimulus (MAGLOIRE *et al.*, 2004).

D'autre part, deux molécules ont été identifiées à partir d'une banque d'ADNc soustractive spécifique de l'odontoblaste : la rééline et la sémaphorine 7A. La rééline est une glycoprotéine de la matrice extra-cellulaire exprimée au cours du développement embryonnaire dans le système nerveux central. Elle est impliquée dans la mise en place de l'architecture cérébrale et dans la modulation de l'adhésion des fibres nerveuses chez l'adulte. Les sémaphorines constituent une grande famille de protéines solubles et membranaires délivrant des signaux d'attraction ou de répulsion aux fibres nerveuses en croissance. Les résultats de l'analyse de ces deux molécules montrent que la rééline, spécifiquement exprimée par les odontoblastes, pourrait être une molécule impliquée dans l'adhésion des fibres

nerveuses avec la matrice extracellulaire péri-odontoblastique. La sémaphorine 7A, quant à elle, pourrait être un facteur neurotrophique permettant l'arrivée des fibres nerveuses au sein de la couche odontoblastique (MAURIN *et al.*, 2004 ; MAURIN *et al.*, 2005).

L'analyse de transcrits géniques d'odontoblastes humains a montré pour la première fois l'expression de canaux sodiques composé d'isoformes de sous unités neurales $\alpha 2$ et $\beta 2$. Les odontoblastes étant capables de générer des potentiels d'action et les sous unités identifiées de se regrouper avec les fibres nerveuses, les odontoblastes seraient ainsi capables de transduction sensorielle et d'initier la transmission douloureuse de la dent (ALLARD *et al.*, 2006).

Ainsi, la présence d'un cil, de molécules délivrant des signaux aux fibres nerveuses (la rééline et la sémaphorine 7A) et de canaux sodiques voltage dépendant au sein de l'odontoblaste confirmerait l'hypothèse que ces cellules sont capables de déclencher le signalement de la douleur.

II.1.2.2. LES CELLULES DE LA COUCHE SOUS ODONTOBLASTIQUE DE HÖHL.

En dessous de la couche acellulaire de Weil, une couche sous-odontoblastique de Höhl est présente. Notons que la zone de Weil, surtout apparente au niveau des cornes pulpaire, contient la majeure partie du plexus capillaire sous-odontoblastique et les branches terminales de fibres nerveuses sensitives et autonomes (plexus de Raschkow).

La couche sous odontoblastique de Höhl contient principalement des cellules fibroblastiques, des cellules de Höhl et des cellules dendritiques immunitaires.

Les cellules de Höhl sont des cellules filles produites lors de la dernière mitose des préodontoblastes. Elles servent de cellules relais et peuvent se différencier en odontoblastes si il faut remplacer un nombre réduit d'odontoblastes (dans le cas d'une carie chronique par exemple) (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

II.1.3. LES CELLULES DE LA PULPE CENTRALE.

La pulpe centrale contient principalement des fibroblastes, des cellules mésenchymateuses indifférenciées et des cellules immunocompétentes.

II.1.3.1. LES FIBROBLASTES.

La principale fonction des fibroblastes pulpaire est l'élaboration et le remaniement de la matrice extracellulaire de la pulpe (PIETTE et GOLDBERG, 2001)

Il faut distinguer les fibroblastes dans la pulpe jeune qui ont une activité métabolique majeure et les fibrocytes dans les pulpes plus âgées qui ont une activité de synthèse beaucoup plus réduite (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Les fibroblastes pulpaire sont allongés, avec un large noyau et un réticulum endoplasmique granuleux bien développé. L'appareil de Golgi est localisé près du noyau et la présence de vésicules de sécrétion reflète l'activité de synthèse de ces cellules. Les fibroblastes sont connectés entre eux par des desmosomes et des jonctions de type GAP ce qui facilite la communication intercellulaire (GOLDBERG et SMITH, 2004). Lors d'une inflammation, les fibroblastes peuvent se différencier en myofibroblastes. La différence entre ces deux types cellulaires est la présence dans les myofibroblastes de faisceaux de microfilaments d'actine de type musculaire lisse (*α -Smooth-muscle-actin*) qui contribuent à la contraction des cellules et/ou de la matrice extracellulaire lors du processus de guérison dans le tissu de granulation (DESMOULIERE *et al.*, 2005).

II.1.3.2. LES CELLULES MESENCHYMATEUSES INDIFFERENCIÉES.

Elles sont les précurseurs des cellules différenciées de la pulpe dentaire. Elles peuvent donner naissance à des fibroblastes ou à des odontoblastes. Leur nombre se réduit avec l'âge, diminuant de ce fait le potentiel régénérateur pulpaire.

Elles sont souvent localisées à proximité des vaisseaux sanguins.

Ce sont les cellules responsables de la formation de la dentine de réparation, nous en reparlerons dans notre quatrième partie sur les données récentes du processus de réparation dentinaire.

II.1.3.3. LES CELLULES IMMUNOCOMPÉTENTES.

Dans la pulpe saine, trois types cellulaires principaux ont été identifiés : les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T.

Les cellules dendritiques sont des « cellules présentatrices d'antigènes ». Elles capturent des antigènes protéiques étrangers de façon non spécifique puis les présentent ensuite aux lymphocytes T4. Ces derniers vont activer d'autres cellules immunocompétentes de la défense immunitaire locale pulpaire comme les macrophages ou les lymphocytes B.

Les macrophages sont impliqués dans l'élimination des cellules mortes de la pulpe non inflammée et si une inflammation s'installe, dans l'élimination des bactéries.

II.1.4. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.

Elle est constituée d'une substance fondamentale et de fibres de collagène.

Le collagène représente environ 34% des protéines pulpaire. Il contient essentiellement du collagène de type I (56%) et III (41%) et en moindre quantité du collagène de type V (2%) et de type VI (0,5%) (GOLDBERG et SMITH, 2004). Les fibres de collagène ont un rôle structural de support.

La matrice extracellulaire contient aussi des protéines non collagéniques (GOLDBERG et SMITH, 2004) :

- La bone sialoprotéine (BSP) et l'ostéopontine.
- La fibronectine.
- L'ostéonectine (présente uniquement dans le germe dentaire).
- Chondroïtines sulfates -4 et -6 (60%), Dermatan sulfate (34%), Kérotane sulfate (2%).
- *Bone morphogenetic proteins* (BMPs).

L'absence de minéralisation pulpaire peut être expliquée par l'absence de molécules spécifiques : les SIBLINGs décrites précédemment dans notre chapitre sur les odontoblastes (GOLDBERG et SMITH, 2004). De plus, l'ostéonectine est retrouvée dans la papille dentaire du germe de la dent, dans les odontoblastes mais pas dans la pulpe de la dent adulte. L'ostéopontine et la bone sialoprotéine sont présentes à la fois dans la pulpe et la dentine, mais leur quantité diffère. Ceci expliquerait en partie l'incapacité de la pulpe à se minéraliser sous certaines conditions physiologiques (GOLDBERG et SMITH, 2004).

II.1.5. INNERVATION ET VASCULARISATION.

Les vaisseaux sanguins pénètrent par la pulpe par le foramen apical sous la forme d'une ou deux artérioles issues des artères dentaires.

Les artérioles se ramifient pour finalement former à la périphérie de la chambre pulpaire un fin réseau de capillaires de 5 à 10 μm de diamètre. Ils sont situés dans la région sous-odontoblastique et sont situés au contact des odontoblastes.

Le réseau veineux assure le retour du sang.

Un réseau lymphatique existe aussi. Il joue le rôle de filtre protecteur et régulateur des fluides interstitiels. Le drainage s'effectue vers les ganglions sous-mentonniers et sous-mandibulaires, puis vers les ganglions cervicaux (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Le réseau nerveux est constitué des fibres sensibles dérivant des branches maxillaire et mandibulaire du nerf trijumeau. Les fibres nerveuses se regroupent au centre de la pulpe radiculaire pour former de volumineux faisceaux qui cheminent au voisinage des vaisseaux sanguins. Ils se divisent ensuite dans la chambre pulpaire en nerfs cuspidiens qui se ramifient près de la périphérie pulpaire; ils se terminent alors dans la zone acellulaire de Weil sous la forme d'un réseau dense appelé plexus nerveux sous-odontoblastique ou plexus de Raschkow (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Ces fibres sensibles sont responsables de la sensibilité pulpodentinaire, observée en réponse à des stimuli mécaniques, thermiques, chimiques ou électriques de la pulpe.

Des fibres vasomotrices sympathiques régulent la microcirculation par un effet vasoconstricteur. Elles sont issues du ganglion cervical supérieur et sont en quantité moins importante que les fibres sensibles (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

II.2. LA DENTINE.

II.2.1. DESCRIPTION GENERALE.

La dentine est un tissu minéralisé, non vascularisé. C'est une substance blanche jaunâtre.

Elle constitue la majeure partie de la dent. Elle circonscrit la chambre pulpaire au niveau de la couronne et elle est revêtue d'émail à cet endroit. Elle entoure les canaux radiculaires au niveau de la racine et elle est revêtue de ciment à ce niveau (AURIOL *et al.*, 2000).

Elle est constituée de 70% de matériel minéral (hydroxyapatite carbonatée et magnésinée), et de 30% d'autres éléments parmi lesquels 20% de matrice organique principalement sous forme de collagène de type I et de 10% d'eau (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

La dentine étant dépourvue de vaisseaux, l'apport de substances nécessaires à sa synthèse et son renouvellement est assurée par la pulpe. C'est pour cette raison que la pulpe et la dentine interagissent ensemble comme une entité fonctionnelle et que le terme de complexe pulpodentinaire a été utilisé (AURIOL *et al.*, 2000).

La dentine est traversée par des tubuli représentant 10 à 30% de son volume et assurant sa perméabilité.

II.2.2. LES DIFFERENTS TYPES DE DENTINE.

Il faut distinguer la prédentine, la mantle dentine, la dentine primaire, secondaire et tertiaire.

II.2.2.1. LA PRESENTINE.

La prédentine est la matière organique dentinaire non minéralisée située à la périphérie de la pulpe entre les odontoblastes et la dentine minéralisée. Son épaisseur est de 15 à 20µm. La transformation de la prédentine en dentine minéralisée se fait grâce aux protéines de la métadentine (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

II.2.2.2. LA MANTLE DENTINE.

La dentine périphérique aussi appelé mantle dentine (manteau dentinaire) est la première couche de dentine sécrétée par les odontoblastes au tout début de leur différenciation. Les odontoblastes qui sécrètent la mantle dentine sont faiblement différenciés. Elle est dépourvue de canalicule. De plus, une des caractéristiques histochimiques de la mantle dentine est

l'absence de phosphoprotéine, ceci pourrait contribuer à l'hypominéralisation de cette couche (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

II.2.2.3. LA DENTINE PRIMAIRE.

Dès que les odontoblastes se sont polarisés, la transformation de prédentine en dentine contribue à la formation de la dentine primaire. Celle-ci s'achève avec la mise en fonction de la dent sur l'arcade.

II.2.2.4. LA DENTINE SECONDAIRE.

Après l'édification complète de la racine, les odontoblastes contribueront à la formation de la dentine secondaire. Cette fonction va en se ralentissant tout au long de la vie mais perdure (PIETTE et GOLDBERG, 2001). Ce changement entre état préfonctionnel et fonctionnel se traduit par une accentuation de la courbure en S des canalicules dentinaires.

La dentine secondaire est plus abondante en périphérie de la chambre pulpaire et s'accumule sur le toit et le plancher pulpaire. Elle entraîne ainsi une diminution asymétrique du volume de la chambre pulpaire et de ses cornes (AURIOL *et al.*, 2000).

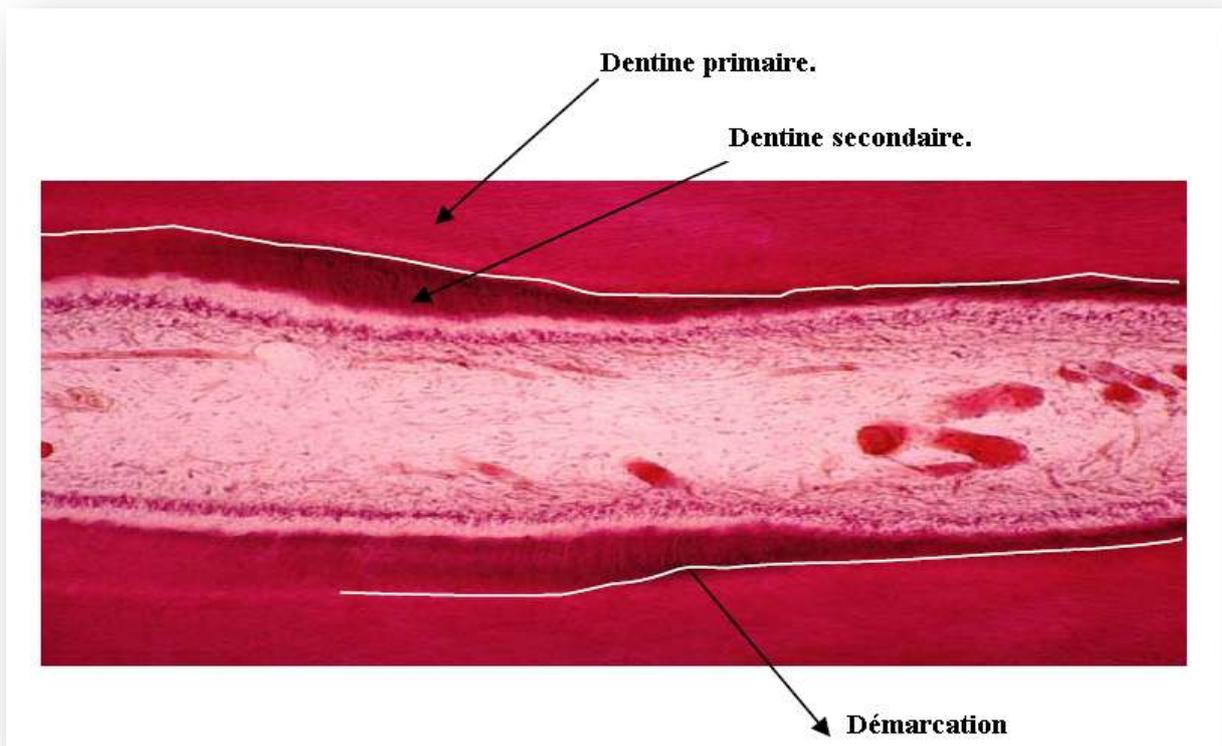


Figure 4 : Coupe déminéralisée colorée montrant la formation de la dentine secondaire au microscope optique (Dr B. ALLIOT-LICHT).

Notons que deux types de dentines existent tant dans la dentine primaire que dans la dentine secondaire : les dentines intercanaliculaire et péricanaliculaire.

II.2.2.5. LA DENTINE TERTIAIRE.

Elle comprend deux types de dentine : la dentine réactionnelle et la dentine de réparation. Elles sont induites suite à divers stimuli nocifs comme une carie ou une restauration dentaire (TZIAFAS *et al.*, 2000).

Ce type de dentine aurait un rôle protecteur de la pulpe (Figure 5).

II.2.2.5.1. La dentine réactionnelle.

La dentine réactionnelle est produite par les odontoblastes différenciés au cours du développement du germe dentaire. Elle est synthétisée lors de lésions moyennes du complexe pulpodentinaire (abrasion, érosion, irritation mécanique, irritation chimique, fracture dentinaire superficielle,...) et sous les caries chroniques à évolution lente caractérisée comme une lésion asymptomatique dure de couleur brun foncée et de profondeur limitée (Figure 5).

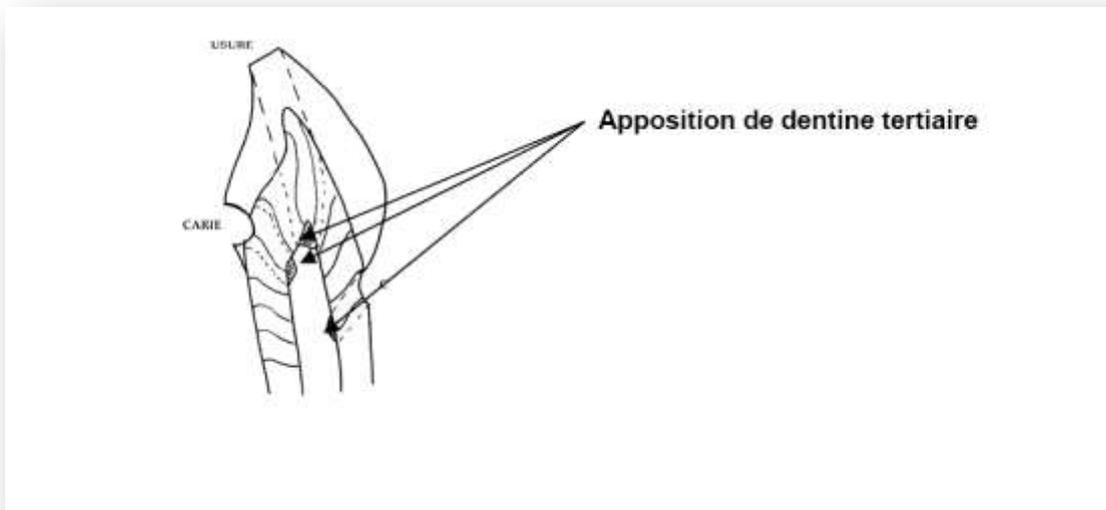


Figure 5 : Apposition de dentine réactionnelle suite à différents stimuli (Dr B.ALLIOT-LICHT)

II.2.2.5.2. La dentine de réparation.

Quand la lésion carieuse s'accélère, la carie passe d'un stade de lésion chronique à un stade de lésion aiguë. Des signes de souffrance odontoblastique apparaissent : ballonnisation des mitochondries, disparition des crêtes mitochondriales et élargissement des espaces interodontoblastiques. On assiste alors à la mort des odontoblastes en regard de la lésion carieuse. Si la progression de la lésion carieuse n'est pas trop rapide pour entraîner la

destruction du tissu pulpaire, celui-ci peut réagir par la mise en place d'une barrière dentinaire : la dentine de réparation (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

La formation de cette dentine se fait grâce à un matériau de coiffage placé au contact de la pulpe exposée. Le résultat final optimal attendu est la reconstitution du défaut dentinaire à l'aide de la formation d'un pont dentinaire (TZIAFAS, 2004).

Avant de développer plus précisément toutes les dernières recherches développées sur la réparation dentinaire, nous allons décrire histologiquement ce type de dentine tertiaire.

La dentine de réparation (Figure 6) commence par la synthèse d'ostéodentine par les cellules pulpaires au contact de la zone de nécrose formée par l'agent de coiffage (l'hydroxyde de calcium que nous développerons dans la partie III). L'ostéodentine ne contient pas de tubule, et elle est moins minéralisée et structurée que la dentine normale. L'ostéodentine est une dentine contenant des inclusions cellulaires, semblable à l'os où des ostéocytes occupent les ostéoplastes (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Les cellules pulpaires qui synthétisent l'ostéodentine sont nommées cellules « osteoblast-like » et constituent la première vague de cellules impliquée dans la formation du pont dentinaire.

L'ostéodentine permettrait de fixer les facteurs de croissance nécessaires à la différenciation des odontoblastes de réparation. Par ailleurs, la fibronectine présente dans l'ostéodentine constitue une surface d'adhésion cellulaire et permettrait ainsi l'« accrochage » des cellules à la matrice extracellulaire puis la polarisation du corps cellulaire à partir de ce point d'ancrage et la formation du prolongement (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Cette première couche de dentine de réparation (ostéodentine) va donc permettre à une seconde vague de cellules migratrices pulpaires de se fixer et de se différencier en odontoblastes de seconde génération ou cellules « odontoblast-like » (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Ces cellules « odontoblast-like » vont alors sécréter une matrice extracellulaire qui va se minéraliser pour former de l'orthodentine. L'orthodentine contient des tubuli et les cellules sont alignées en périphérie. Ces tubuli ont un trajet plus tourmenté que dans la dentine saine et sont orientés de manière plus divergente.

Le corps cellulaire des « odontoblastes-like » est moins allongé que celui des odontoblastes physiologiques.

Le pont dentinaire formé est donc constitué de deux couches de dentines : une première couche d'ostéodentine et une deuxième couche d'orthodentine.

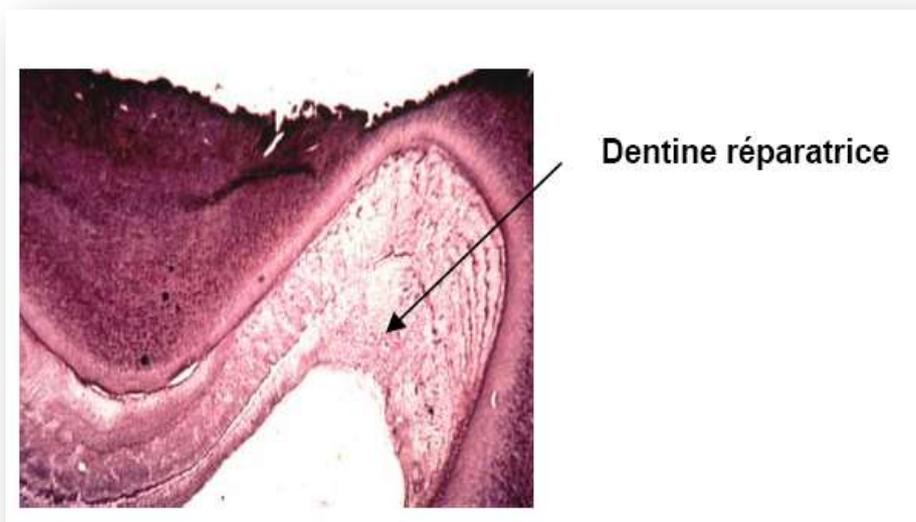


Figure 6 : la dentine de réparation en microscopie optique

(Image fournie par le Dr B.ALLIOT-LICHT)

L'objectif ultime des thérapies régénératives grâce au coiffage direct est d'induire la différenciation de cellules « odontoblast-like » permettant de former de la dentine de réparation (TZIAFAS, 2004).

La stimulation du tissu pulpaire peut donc induire la formation de dentine de réparation. Des molécules placées en fond de cavité juxta-pulpaire aboutissent à la formation d'un pont dentinaire.

Nous allons donc exposer quelles sont les thérapeutiques actuelles permettant cliniquement d'obtenir la formation de la dentine de réparation et d'ainsi préserver la vitalité de la dent.

III. THERAPEUTIQUES ACTUELLES.

III.1. LE COIFFAGE DIRECT.

III.1.1. DEFINITION.

Le coiffage pulpaire direct consiste en la pose d'un matériau placé directement sur la pulpe exposée accidentellement au cours d'un traumatisme ou suite à une préparation cavitaire, ou lors d'une éviction carieuse (EUROPEAN SOCIETY OF ENDOTONLOGY, 2006).

Idéalement, la pulpe répond avec la formation d'une barrière tissulaire minéralisée le long de la surface exposée, appelée le pont dentinaire.

Le coiffage pulpaire direct permet la stimulation de la dentinogénèse de réparation et la préservation de la vitalité pulpaire.

III.1.2 INDICATIONS.

Le coiffage direct doit être pratiqué sur une pulpe saine indemne de toute inflammation. L'indication est donc difficile à poser, puisque l'inflammation pulpaire est en général asymptomatique.

On peut considérer que la pulpe est indemne de toute inflammation quand son exposition a été accidentelle, comme lors d'une fracture ou lors d'une préparation d'une couronne sur une dent intacte. Quand l'exposition pulpaire a lieu lors d'une éviction carieuse, la pulpe est considérée comme étant déjà inflammée ce qui augmente le taux d'échec.

Même lorsque la dent est saine lors de l'exposition pulpaire, celle-ci va devenir inflammatoire rapidement si elle reste exposée à l'environnement buccal. Des bactéries vont coloniser la surface de la blessure et envahir les couches superficielles de la pulpe à la faveur du caillot sanguin qui s'y est constitué. Dès la 24^{ème} heure après l'exposition pulpaire, les cellules de l'inflammation sont nombreuses dans la pulpe sous-jacente. Le coiffage doit donc être fait dans les 24 heures qui suivent l'exposition pulpaire (RIETSCH, 2005).

Pour réaliser un coiffage direct sur dent permanente lors d'une exposition pulpaire accidentelle, les conditions requises sont les suivantes :

- Exposition pulpaire accidentelle récente inférieure à 24 heures.
- Dent permanente immature.
- Dent permanente mature avec un plan de restauration simple.
- Dimension de l'exposition pulpaire faible (0,5-1,5 mm).
- Localisation de l'exposition (cornes pulpaires, jamais en cervical).
- Dent indemne de toute inflammation sans antécédent douloureux.
- Quantité de saignement (modéré ou séreux hémorragique jamais fortement hémorragique ou purulent).
- Absence de lésion périapicale à l'examen radiologique.
- Patient motivé avec une bonne hygiène bucco-dentaire.
- Possibilité de suivi clinique et radiographique (OLIVI *et al.*, 2007).
-

Pour réaliser un coiffage direct sur dent permanente lors d'une exposition pulpaire par éviction carieuse, les conditions requises en plus de celles citées précédemment sont les suivantes :

- Absence de symptôme douloureux.
- Type de restauration choisie (pas sur une dent qui nécessite une restauration prothétique) (OLIVI *et al.*, 2007).

III.1.3. CONTRE-INDICATIONS.

Les contre-indications du coiffage pulpaire direct sont les suivantes :

- Dent inflammée par la mise à nu de la pulpe due à une carie profonde.
- Dent présentant des signes de pathologie pulpaire irréversible.
- Dent nécrosée.
- Présence d'image radiologique apicale.
- Dent permanente mature avec un plan de restauration complexe.
- Temps de latence entre le traumatisme et l'intervention supérieure à 24 heures.
- Patient non motivé avec une mauvaise hygiène bucco-dentaire.
- Ouverture buccale insuffisante ou inaccessibilité du site.
- Impossibilité de suivi clinique ou radiologique.
- Patient atteint d'affections aiguës ou chroniques (diabète, affections cardiaques, patient sous chimiothérapie...).
- Patient handicapé. (RIETSCH, 2005)

III.2. PROTOCOLE OPERATOIRE.

Le protocole opératoire du coiffage pulpaire direct est le suivant :

- Anesthésie
- Mise en place de la digue
- Curetage dentinaire (réalisé uniquement s'il existe une lésion carieuse)
- Contrôle hémorragique et désinfection cavitaire.
- Séchage cavitaire
- Pose du produit de coiffage
- Pose du matériau d'obturation coronaire.

III.2.1. ANESTHESIE.

Elle permet le travail sans douleur pour le patient.

III.2.2. POSE DE LA DIGUE.

La réussite du coiffage dépend d'une asepsie stricte, il est donc nécessaire de poser la digue.

III.2.3. CURETAGE DENTINAIRE.

Il est effectué seulement en cas d'exposition pulpaire due à une carie.

Le curetage doit être effectué méthodiquement. On enlève d'abord le tissu carieux des parois de la cavité puis on termine au niveau de la paroi pulpaire.

III.2.4. CONTROLE HEMORRAGIQUE ET DESINFECTION CAVITAIRE.

Rappelons que l'absence de contrôle hémorragique conduit à des complications. KITASAKO *et al.* (1999) ont suggéré que la protrusion du tissu pulpaire dans la cavité est due à un faible contrôle de l'exsudation avant de réaliser le coiffage.

Un contrôle hémorragique efficace influence le résultat du coiffage pulpaire direct et améliore le pronostic vital de la dent.

Un agent hémostatique idéal doit donc être bactériostatique et/ou bactéricide quand il est utilisé sur des expositions pulpaires dues à des lésions carieuses. Si le contrôle hémorragique échoue, un caillot sanguin se forme entre le matériau de coiffage et le tissu pulpaire, empêchant de ce fait leur contact. On a alors une inflammation chronique qui empêche le processus de guérison pulpaire (COSTA *et al.*, 2001).

Les agents hémostatiques utilisés avant le coiffage direct sont l'hypochlorite de sodium à 5,25%, ou la chlorhexidine à 0,12%.

L'application d'hypochlorite de sodium a été montrée comme étant efficace dans le coiffage pulpaire et a montré sa biocompatibilité en tant qu'agent hémostatique (COSTA *et al.*, 2001).

D'un autre côté, des effets cytotoxiques sévères ont été montrés avec l'hypochlorite de sodium même en faible concentration *in vitro* (HELING *et al.*, 2001).

Les effets de la chlorhexidine sont eux aussi contradictoires suivant les études (SILVA *et al.*, 2006).

Une étude récente de SILVA *et al.* (2006), a voulu étudier si les agents hémostatiques pouvaient empêcher le processus de dentinogénèse de réparation lors de coiffage pulpaire direct à l'hydroxyde de calcium sur des dents humaines.

Trois agents hémostatiques ont été appliqués avant le coiffage direct à l'hydroxyde de calcium sur 45 troisièmes molaires maxillaires humaines qui devaient être extraites pour raison orthodontiques :

- la solution saline à 0.9% appliquée sur 14 dents.
- l'hypochlorite de sodium à 5,25% appliquée sur 16 dents.
- le digluconate de chlorhexidine à 2% appliquée sur 15 dents.

Suivant les normes de l'ISO (*International Standardisation Organisation*) (ISO-7405, 1997), les dents ont respectivement été extraites à 7 jours, 30 jours et 90 jours et elles ont été analysées suivant des critères histologiques précis.

Les analyses statistiques des résultats ont montré que la réponse inflammatoire diminuait au cours du temps alors que la formation de dentine de réparation augmentait avec les trois solutions utilisées ($p < 0,05$). Aucune différence significative n'a été observée entre les agents pour la formation de dentine de réparation.

Les solutions utilisées dans cette étude sont biocompatibles. Il est pourtant observé une réponse inflammatoire mineure à 7 jours avec l'hypochlorite de sodium et le digluconate de chlorhexidine, contrairement à ce qui est observé avec la solution saline. Mais cette inflammation précoce n'interfère pas avec la capacité de guérison du tissu pulpaire puisqu'à 90 jours une barrière minéralisée est constatée ainsi que l'absence d'inflammation.

Cette étude montre donc des résultats similaires entre l'hypochlorite de sodium et le digluconate de chlorhexidine comparés au groupe contrôle et qu'aucun de ces agents n'interfère avec le processus de guérison pulpaire sur dent saine.

De plus, SILVA *et al.* (2006) notent que l'hypochlorite de sodium engendre plus de formation de dentine réactionnelle à 90 jours que les autres solutions. Il relie ce résultat au fait que

l'hypochlorite de sodium à la capacité de solubiliser la matrice dentinaire minéralisée ce qui engendre la libération de facteurs de croissance comme le TGF- β . Il a été démontré que le TGF- β 1 et le TGF- β 3 avaient la faculté de stimuler l'activité odontoblastique et d'ainsi augmenter la minéralisation (SMITH, 2003).

III.2.5. PRODUIT DE COIFFAGE.

Après le rinçage de la cavité, on procède à la pose du matériau de coiffage.

Le matériau de coiffage idéal doit contrôler les risques infectieux, adhérer à la dentine, être cliniquement facile d'utilisation, et promouvoir la dentinogénèse de réparation.

III.2.5.1. L'HYDROXYDE DE CALCIUM.

L'hydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) est de la chaux éteinte obtenu à partir de la chaux vive hydratée et se présente sous la forme d'une fine poudre blanche. On obtient la chaux éteinte par hydratation de la chaux vive (oxyde de calcium CaO) par l'eau, suivant la réaction:



Sa radio opacité est voisine de celle de la dentine.

Le $\text{Ca}(\text{OH})_2$ est utilisé en dentisterie depuis 1930 par HERMANN.

Il existe sous forme de préparations commerciales ou sous forme de préparations magistrales extemporanées. Les préparations magistrales extemporanées sont réalisées au moment de l'intervention à partir d'une poudre pure d'hydroxyde de calcium et de sérum physiologique stérile.

Il a plusieurs propriétés biologiques qui en font un matériau de choix dans le coiffage direct :

Il a une *action anti-inflammatoire*. Il présente un pH alcalin de 12,6 qui neutralise l'acidose due à l'inflammation ainsi qu'une libération progressive et prolongée d'ions hydroxyle OH⁻ et d'ions calcium Ca²⁺.

Il est *antibactérien* grâce à son action bactéricide et organolytique.

Il est *anti-hémorragique* grâce à la libération d'ions calcium Ca²⁺ qui mène à la contraction des capillaires sanguins. Cette contraction des capillaires engendre une nécrose superficielle des tissus au contact de l'hydroxyde de calcium (ESTRELA *et al.*, 1995).

Il est *anti-exsudatif* en captant l'exsudat inflammatoire.

Il a une action *minéralisante*. D'une part le pH alcalin favorise l'action de la phosphatase alcaline (TRONSTAD *et al.*, 1981) ; d'autre part l'hydroxyde de calcium apporte des ions [Ca²⁺] dans un environnement riche en ions phosphate. Cette double action mène à la formation de cristaux d'hydroxyapatite Ca₁₀(PO₄)₆OH₂.

Il favorise la *différenciation des cellules odontoblast-like*. En effet, les cellules pulpaires humaines mises en culture dans un milieu additionné d'hydroxyde de calcium se différencient en odontoblastes-like après 4 semaines *in vitro* (SEUX *et al.*, 1991).

L'hydroxyde de calcium est donc efficace quand il est placé directement au contact de la pulpe lésée dans l'induction de la dentinogénèse de réparation. Il entraîne un effet anti-inflammatoire et permet de créer une interface sur laquelle les odontoblastes peuvent proliférer et synthétiser une nouvelle matrice minéralisée (TORABINEJAD et WALTON, 2002).

Dans le cas d'un coiffage direct à l'hydroxyde de calcium, il est recommandé d'effectuer le coiffage pulpaire à l'aide d'une préparation magistrale extemporanée, puis de protéger le coiffage par une seconde couche d'hydroxyde de calcium, cette fois sous forme de préparation commerciale chemodurcissante type DYCAL® ou LIFE®.

Lors de la mise en place de l'hydroxyde de calcium au contact d'une pulpe saine, il se produit une nécrose superficielle. Celle-ci permet une diminution de l'hémorragie et de l'inflammation ainsi qu'une élimination des bactéries susceptibles d'être présentes sur le site lésé. Il se produit un phénomène de cautérisation. Puis, il se forme alors un pont dentinaire constitué de deux couches de dentines décrites dans la partie II.2.2.4.2.: une couche d'ostéodentine et une couche d'orthodentine. La couche d'ostéodentine se forme rapidement entre 15 jours en trois semaines et elle est imperméable. La couche d'orthodentine perméable et tubulaire se forme ensuite (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Cependant ce matériau a des propriétés physiques instables ce qui provoque une migration de particules de l'agent de coiffage au sein du tissu pulpaire. La guérison pulpaire peut ainsi être compliquée par une inflammation pouvant aboutir à la nécrose de la pulpe (MURRAY et GARCIA-GODOY, 2006).

Par ailleurs, l'utilisation du Ca(OH)_2 engendre la formation d'un pont dentinaire souvent de mauvaise qualité présentant des défauts, sous la forme de tunnels qui permettent l'infiltration bactérienne (COX *et al.*, 1996).

Ce matériau n'est pas étanche et la plupart des produits contenant de l'hydroxyde de calcium se dissolvent au bout de un an.

L'hydroxyde de calcium demeure le matériau de choix dans les indications de coiffage direct, pourtant, la littérature fait état des qualités du Mineral Trioxyde Aggregate (MTA®) qui constitue une perspective intéressante.

III.2.5.2. LE MINERAL TRIOXYDE AGGREGATE.

Le Mineral Trioxyde Aggregate a été développé dans les années 1990. C'est un gel colloïdal de pH basique de 12,5, lui conférant un certain pouvoir bactéricide, obtenu par mélange d'eau stérile et de fines particules hydrophiles d'une poudre d'oxyde de minéraux dans un rapport de 3/1. Ce gel qui se solidifie au bout de quatre heures a une solidité comparable à celle d'un IRM® (ciment d'oxyde de zinc-eugénol renforcé).

La composition du MTA est la suivante (CAMILLERI et PITT FORD, 2006) :

- 50 à 75% d'oxyde de calcium et 15 à 25% de dioxyde de silicone. Ces deux composants forment 70-95% du ciment.

Ces deux matériaux bruts mélangés forment du silicate tricalcique, du silicate dicalcique, de l'aluminate tricalcique et de l'alumino-ferrite tetracalcique. En additionnant de l'eau, le ciment hydraté forme un gel de silicate.

C'est en fait du ciment de Portland avec en très faible quantité de l'oxyde de bismuth destiné à radio-opacifier l'ensemble pour l'examen radiologique.

Le MTA a une adhésion aux tissus durs de la dent excellente et est non résorbable ce qui assure une bonne étanchéité bactérienne (TZIAFAS *et al.*, 2002; ANDELIN *et al.*, 2003).

Ce matériau une fois durci, est biocompatible ; il induit une augmentation de la croissance cellulaire (CAMILLERI et PITT FORD, 2006). Il n'est ni cytotoxique, ni mutagène.

Le MTA est un outil intéressant pour le coiffage pulpaire car il permet la formation de pont dentinaire (TORABINEJAD et COCHET, 2002).

Pour résumer, le MTA présente :

- Un pH basique à 12,5 lui donnant un certain pouvoir bactéricide.
- La capacité d'adhérer aux tissus durs de la dent.
- Une longue stabilité dans le temps.
- Le déclenchement de la formation de la dentine de réparation.
- Une absence de cytotoxicité et une absence de pouvoir mutagène.
- Une résistance mécanique proche de celle de la dentine.

Le MTA a ainsi été comparé à l'hydroxyde de calcium comme agent de coiffage direct sur 14 dents humaines permanentes sur une période de six mois (AEINEHCI *et al.*, 2003). L'ensemble des résultats montrent moins d'inflammation, d'hyperhémie et de nécrose ainsi que la formation d'un pont dentinaire plus épais avec le MTA en comparaison avec l'hydroxyde de calcium. Pourtant, aucune analyse statistique fiable n'a pu être rapportée dans cette étude.

Une étude de FARSI *et al.* (2006), a évalué cliniquement et histologiquement l'efficacité du MTA comme matériau de coiffage direct sur les dents permanentes immatures.

30 enfants entre 9 et 12 ans ont participé à l'étude. Chaque enfant présentait une lésion carieuse profonde sur une molaire permanente immature sans symptomatologie et répondant aux indications de coiffage direct décrites précédemment.

Il a été observé au bout de 24 mois, sur 28 des 30 dents où le coiffage a été réalisé, une apexification signifiant la conservation de la vitalité pulpaire. Les auteurs concluent que le MTA pourrait être recommandé en tant que matériau de choix dans le coiffage pulpaire des dents permanentes avec exposition pulpaire.

Notons que dans cette étude les auteurs ont étudié la préservation de la vitalité pulpaire mais qu'ils n'ont pas montré la formation de pont dentinaire. De plus, aucun groupe contrôle n'a été utilisé.

Une étude de NAIR *et al.* (2008), a étudié et comparé la réponse pulpaire suite au coiffage pulpaire direct de dents humaines saines avec le MTA et avec l'hydroxyde de calcium (sous forme de DYCAL®, préparation commerciale chemodurcissante). 33 dents ont ainsi été utilisées pour participer à cette analyse. Ces dents ont été extraites à une semaine, un mois ou trois mois et étudiées au microscope optique et au microscope à transmission.

Les résultats obtenus qualitativement montrent qu'au bout d'une semaine après le coiffage avec le MTA il n'y a aucune inflammation et que la plaie pulpaire est recouverte d'un pont dentinaire qui augmente en épaisseur et en largeur après trois mois.

Dans cette étude, lors du coiffage au MTA, 3 dents sur 6 observées à un mois montrent un pont dentinaire complet et 4 dents sur 5 ont un pont dentinaire complet à 3 mois.

L'analyse du nombre et du type de cellules pulpaires présentes a aussi été faite ainsi que l'analyse de l'épaisseur et de la taille du pont dentinaire.

Il s'avère que dans cette étude peu de cellules inflammatoires sont présentes avec le MTA par rapport à l'hydroxyde de calcium : la proportion de cellules polymorphonucléaires et de lymphocytes est ainsi significativement plus faible avec le MTA qu'avec l'hydroxyde de calcium ($p < 0,05$ et $p < 0,001$ respectivement).

Il apparaît ainsi que le MTA dans cette analyse a d'excellentes propriétés pour prévenir l'inflammation pulpaire.

L'auteur conclut que le MTA est plus facile à utiliser cliniquement et que l'inflammation pulpaire est moins importante qu'avec l'hydroxyde de calcium. Par ailleurs, la formation de la barrière minéralisée est de meilleure qualité.

Il en vient alors à la conclusion que le Mineral Trioxide Aggregate devrait être le matériau de choix dans les procédures de coiffage pulpaire direct plutôt que l'hydroxyde de calcium recommandé actuellement dans de tels traitements.

Précisons que dans cette étude, les auteurs ont effectué le coiffage direct à l'hydroxyde de calcium au DYCAL® seul. Il aurait été préférable de pratiquer un coiffage à l'hydroxyde de calcium en deux couches comme précédemment décrit: une première couche d'hydroxyde de calcium préparé magistralement grâce à un mélange de chaux éteinte et de sérum physiologique stérile suivie d'une deuxième couche d'hydroxyde de calcium sous forme de préparation commerciale chemodurcissante.

Le MTA semble être prometteur dans le coiffage direct, mais d'autres études doivent être menées pour analyser la formation du pont dentinaire. Par ailleurs, le recul clinique n'est pas encore assez important. L'hydroxyde de calcium demeure donc le matériau de choix dans les procédures de coiffage direct.

III.2.5.3. LES RESINES ADHESIVES.

Les résines adhésives sont classiquement décrites comme étant toxiques pour la pulpe, par conséquent le contact direct avec le tissu pulpaire devrait être proscrit.

En effet, l'absence d'effet cytotoxique est un pré requis pour l'utilisation d'un matériau placé au contact de cellules vivantes. Or, la cytotoxicité des matériaux résineux et de leurs composants a largement été décrite. Il a été montré que de faibles concentrations de 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), le bis-glycidylmethacrylate (bis-GMA), biphenolA (BPA), l'uréthane diméthacrylate (UDMA) et d'autres composants résineux étaient cytotoxiques sur les cultures cellulaires de fibroblastes (KOLINIOTOU-KOUMPA et TZIFAS, 2005).

Ces composants résineux ont des effets inhibiteurs sur la synthèse d'ADN, et la synthèse de protéines (KOLINIOTOU-KOUMPA et TZIAFAS, 2005).

ABOUT *et al.* (2002) ont étudié *in vitro* l'impact des monomères résineux sur la différenciation des cellules de la pulpe dentaire humaine en odontoblastes. Il apparaît qu'en présence de ces monomères, il n'y a plus d'expression de la protéine DSP (sialoprotéine dentinaire) exprimée par les odontoblastes, ainsi qu'une inhibition de la formation de nodules minéralisés. D'après cette étude, les monomères résineux empêcheraient la différenciation des odontoblastes.

Des études ont pourtant été menées pour savoir si les résines adhésives convenaient au coiffage pulpaire direct.

Plusieurs auteurs ont montré que les systèmes adhésifs étaient biologiquement compatibles sur les pulpes exposées permettant ainsi la guérison pulpaire avec la formation d'une barrière minéralisée même en l'absence d'hydroxyde de calcium (HAFEZ *et al.*, 2002).

HAFEZ *et al.* (2002) ont donc pratiqué 90 cavités de classe V avec des expositions pulpaires mécaniques sur des dents de singes. Les pulpes ont été désinfectées à l'hypochlorite de sodium 3% et coiffées de deux types différents d'adhésifs dentinaires (All-Bond 2® et AEIitefil® ou One-Step® et Resinomer®). Ces cavités ont été histologiquement observées suivant les normes ISO usuelles.

Les auteurs ont pu montrer que 86% des pulpes traitées à l'hypochlorite de sodium 3% et les systèmes adhésifs cités précédemment montrent une réorganisation tissulaire et la formation de pont dentinaire.

D'autres études présentent des résultats différents.

L'étude de LU *et al.* (2006) a effectué des coiffages directs sur 130 chiens en appliquant un système adhésif sur certaines pulpes et de l'hydroxyde de calcium sur d'autres pour évaluer la biocompatibilité et les effets du scellement adhésif.

Voici la manière dont les groupes ont été constitués :

- 60 dents ont été coiffées de Clearfil SE Bond (SB), un adhésif automordant.
- 60 dents ont été coiffées de Dycal®, un hydroxyde de calcium (CH).
- 10 dents ont servi de cas témoins et aucune cavité n'a été réalisée sur ces spécimens.

Toutes les cavités ont été restaurées suite au coiffage avec du composite.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau suivant :

	7 jours	30 jours	90 jours
CH	<p>Sur les 20 dents extraites :</p> <p>2/20 : réponse inflammatoire sévère.</p> <p>Aucune dent ne présente un pont dentinaire.</p>	<p>Sur les 20 dents extraites :</p> <p>11/20 : Fine ligne calcifiée partiellement sans réaction inflammatoire.</p> <p>5/20 : pont dentinaire incomplet</p> <p>2/20 : pas de pont dentinaire, pas d'inflammation.</p> <p>2/20 : pas de pont dentinaire mais présence d'une inflammation, et de bactéries.</p>	<p>Sur les 20 dents extraites :</p> <p>- 15/20 : pont dentinaire complet.</p> <p>Les autres dents ne présentent pas de pont dentinaire.</p>
SB	<p>Sur les 20 dents extraites :</p> <p>1/20 : réponse inflammatoire</p> <p>Aucune dent ne présente un pont dentinaire</p>	<p>Sur les 20 dents extraites :</p> <p>2/20 : fine ligne calcifiée partiellement sans réaction inflammatoire.</p> <p>-18/20 : pas de pont dentinaire.</p> <p>-Aucune dent ne présente des bactéries.</p>	<p>Sur les 20 dents extraites :</p> <p>-1/20 : pont dentinaire complet.</p> <p>Les autres dents ne présentent pas de pont dentinaire.</p>
Contrôle	Tous les spécimens montrent une ligne odontoblastique normale, une zone de Weil, une zone riche en cellules et un tissu pulpaire normal.		

Les auteurs concluent donc à la vue de ces résultats que le groupe SB prévient l'irritation bactérienne. Par contre, il y a moins de formation de pont dentinaire.

Pour conclure, cette étude est en faveur de l'hydroxyde de calcium *versus* les adhésifs dentinaires.

Les différentes études réalisées sur les résines adhésives montrent des résultats contradictoires. D'autres recherches doivent être menées pour clarifier l'avenir des adhésifs dans l'indication de coiffage direct.

III.2.6. POSE DU MATERIAU D'OBTURATION CORONAIRE.

Il faut ensuite procéder à la pose du matériau d'obturation coronaire.

Il est préférable de faire cette reconstitution définitive dans la même séance que le coiffage à l'aide d'un amalgame ou d'un composite. Si cela n'est pas possible dans la séance, il faut poser un ciment verre ionomère ou un ciment d'oxyde de zinc-eugénoï renforcé type IRM®.

Grâce à l'utilisation de ces techniques de coiffage, on arrive non seulement à préserver la vitalité pulpaire, mais aussi à obtenir une barrière minéralisée protégeant la pulpe d'une nouvelle agression.

Des cellules issues du centre de la pulpe se divisent et migrent au contact de la zone lésée pour se différencier en odontoblastes de remplacement ou odontoblastes de deuxième génération ou « odontoblastes-like cells ». Ces cellules seraient issues de fibroblastes pulpaires, de cellules mésenchymateuses indifférenciées ou de péricytes.

Quelle est l'origine de ces cellules migratrices ? Quels sont les mécanismes intervenant dans le processus de réparation ?

Plusieurs hypothèses ont été avancées et c'est ce que nous allons décrire en détail dans notre partie suivante : les données récentes sur le processus de réparation dentinaire.

IV. LE PROCESSUS DE REPARATION DENTINAIRE (DONNEES RECENTES).

IV.1. LES CELLULES POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE LA FORMATION DE DENTINE DE REPARATION.

IV.1.1. GENERALITES SUR LES CELLULES SOUCHES.

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables d'autorenouvellement et de différenciation. Elles contribuent ainsi à la régénération tissulaire. Elles peuvent théoriquement se diviser sans limite pour réapprovisionner des cellules perdues tout au long de la vie. La division cellulaire est dite clonogénique car les cellules donnent naissance à des cellules matures identiques à elles-mêmes.

Il existe deux types de cellules souches : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes (CASAGRANDE *et al.*, 2006).

Jusqu'au septième jour de vie intra utero, les cellules de l'embryon sont totipotentes : elles peuvent reformer un organisme entier. Après ce stade, les cellules souches embryonnaires germinales conservent un potentiel de différenciation qui leur permet de former tous les tissus de l'organisme, mais perdent leur capacité à former un organisme entier. Elles sont dites pluripotentes (RENARD *et al.*, 2007) (Figures 7 et 8).

En France, la législation et les lois bioéthiques relatives à la recherche sur les cellules embryonnaires limitent les études scientifiques sur les cellules souches embryonnaires humaines. De plus, ces cellules présentent aussi des risques cancérigènes et sont immunogènes (RENARD *et al.*, 2007). C'est pour ces raisons que les travaux de recherche se sont orientés vers l'étude des cellules souches adultes.

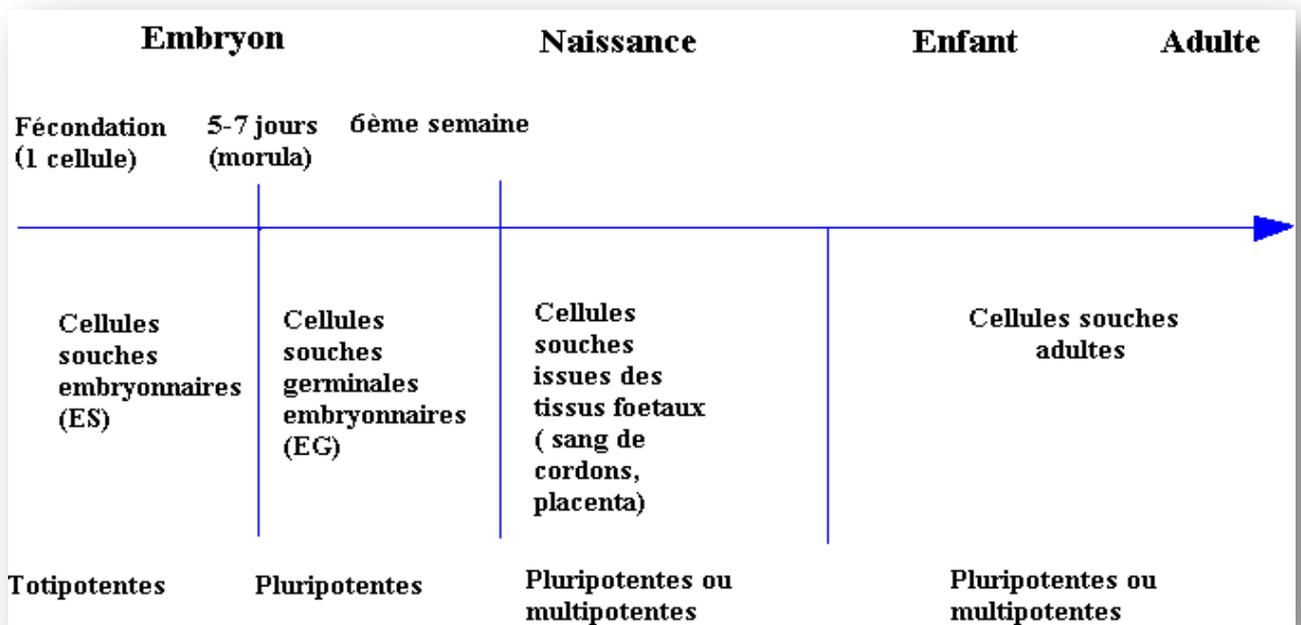


Figure 7 : Les différents types de cellules souches. D'après E. Renard (2007).



Figure 8 : Exemple de cellules souches embryonnaires pluripotentes : schéma récapitulatif résumant la capacité de différenciation des cellules des crêtes neurales. D'après E. Renard (2007).

Les cellules souches adultes sont des cellules indifférenciées qui régénèrent le tissu dans lequel elles résident. Leur rôle est donc dans l'organisme vivant de maintenir et de réparer le tissu dans lequel elles se trouvent. Quasiment tous les tissus de l'organisme sont concernés, mis à part le pancréas ou le cœur par exemple qui ne régénèrent pas.

La plupart des cellules souches adultes sont multipotentes c'est-à-dire qu'elles donnent naissance à un nombre restreint de cellules. Par exemple, les cellules hématopoïétiques sont à l'origine des cellules de la lignée sanguine (les polynucléaires, les lymphocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les globules rouges et les plaquettes).

Cependant, des expérimentations ont montré que certaines de ces cellules pouvaient être pluripotentes c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en un grand nombre de tissus différents de leur tissu d'origine.

Par exemple, les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse mises en culture, une ou deux par boîte (dilution limite), peuvent former des clones par autorenouvellement. Puis à l'aide d'un milieu inducteur spécifique, ces cellules peuvent se différencier en un type cellulaire choisi. Ces cellules sont ainsi capables de se différencier en différents types cellulaires comme en ostéoblastes, en fibroblastes, en adipocytes, etc. (RENARD *et al.*, 2007).

Les cellules souches adultes ont été trouvées dans de nombreux tissus : la moelle osseuse, le cerveau, le muscle squelettique, le foie, la peau, le tissu adipeux et plus récemment la pulpe dentaire (CASAGRANDE *et al.*, 2006).

IV.1.2. LES CELLULES SOUCHES DE LA PULPE DENTAIRE.

Rappelons que lors de l'apoptose des odontoblastes de première génération, des précurseurs pulpaire peuvent se différencier en odontoblastes de deuxième génération pour former de la dentine de réparation.

Si l'atteinte pulpaire est large, les odontoblastes et les cellules de la couche sous odontoblastique sont éliminés. Dans ce cas, les cellules réparatrices de la pulpe endommagée sont recrutées, prolifèrent et après différenciation sont impliquées dans la formation d'un pont

dentinaire comme le paragraphe II.2.2.4.2 le décrit (GOLDBERG *et al.*, 2006). Cette dentine réparatrice est secrétée par des odontoblastes-like issus de la différenciation des cellules progénitrices ou cellules souches pulpaires (TZIAFAS *et al.*, 2000, 2001).

L'identification des précurseurs des odontoblastes-like par des marqueurs cellulaires spécifiques permettrait de mieux comprendre le processus de réparation qui se produit lors d'une agression pulpaire et d'envisager à terme une application clinique.

En culture primaire, les cellules pulpaires sont capables de former une matrice minéralisée. Elles ont un potentiel de différenciation spontané et forment des nodules minéralisés. Ces cellules en culture secrètent des protéines présentes dans la matrice dentinaire : la phosphoprotéine dentinaire (DPP), la sialoprotéine dentinaire (DSP) et la protéine de la matrice dentinaire (DMP1), ainsi qu'une enzyme impliquée dans le processus de minéralisation : la phosphatase alcaline. On a ainsi supposé que la pulpe dentaire contenait des progéniteurs odontoblast-like *in vitro* (COUBLE *et al.*, 2000; ALLIOT-LICHT *et al.*, 2001).

Mais la présence de cellules souches a été découverte par l'identification des marqueurs des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse dans la pulpe.

IV.1.2.1. ISOLATION DES CELLULES SOUCHES DE LA PULPE DENTAIRE.

IV.1.2.1.1. Isolation des cellules souches de la pulpe dentaire par protocole d'immuno-sélection.

Des marqueurs membranaires des cellules souches mésenchymateuses ont été identifiés sur certaines cellules de la pulpe dentaire ce qui a permis de supposer la présence de cellules souches au sein de la pulpe.

L'isolation des cellules souches de la pulpe dentaire se fait selon un protocole d'immuno-sélection à l'aide d'anticorps monoclonaux qui reconnaissent des marqueurs membranaires spécifiques. On peut ainsi sélectionner les cellules souches soit avec le marqueur CD146, soit avec le marqueur STRO-1.

Isolation de cellules CD146.

CD146 est un marqueur membranaire spécifique des cellules de Rouget situées à la périphérie des vaisseaux sanguins. Ces cellules sont des myofibroblastes ou péricytes qui présentent dans leur cytosquelette de l' α -actine. Ces cellules ont des propriétés de cellules souches : autorenouvellement et différenciation (RENARD *et al.*, 2007).

GRONTHOS et son équipe (2000,2002) ont montré que les cellules CD146 de la pulpe dentaire possédaient des capacités d'autorenouvellement et étaient hautement prolifératives, propriétés primordiales des cellules souches.

De plus, ils ont implantés dans des souris immunodéprimées en sous-cutanée des cellules CD-146 de la pulpe dentaire avec un mélange HA/TCP (hydroxyapatite/ phosphate tricalcique) sous forme de poudre. Les DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*) ont engendré une minéralisation similaire à la dentine à la surface des particules. Les cellules isolées seraient donc des précurseurs d'odontoblast-like.

MIURA et ses collaborateurs (2003) ont réussi à isoler des cellules CD146 dans la dent temporaire humaine exfoliée. Ces cellules, nommées les SHEDs (*Stem Cells Human Exfoliated Deciduous teeth Stem*) présentent une forte capacité proliférative et peuvent *in vitro* donner des cellules odontoblast-like.

Une étude d'Alliot-Licht *et al.* (2006) a sélectionné des cellules CD146 de la pulpe dentaire et a montré par dilution limite leur activité hautement proliférative par l'apparition de colonies ce qui est une caractéristique de cellule souche.

Toutes ces études concordent avec le fait que les cellules CD146 isolées seraient des cellules souches de la pulpe dentaire progénitrices d'odontoblast-like.

Isolation de cellules STRO-1.

STRO-1 est un antigène de surface présent sur les précurseurs de différents types de cellules stromales incluant les fibroblastes, les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes, les cellules musculaires lisses de la moelle osseuse adulte et fœtale. C'est un marqueur des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse.

YU et ses collaborateurs (2007) ont isolé des DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*) STRO-1+.

Le potentiel de différenciation odontogénique de ces cellules a été mis en évidence *in vitro* par l'apparition d'une matrice minéralisée, l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et l'expression du gène DSPP (sialophosphoprotéine dentinaire). Les auteurs ont aussi implantés ces cellules STRO-1+ dans des capsules rénales de rat mixées avec un milieu inducteur de la dentinogénèse. Ils ont observé *in vivo* la formation d'une structure en forme de dent.

Cette étude confirme que les DPSCs STRO-1+ seraient des précurseurs odontoblastiques de la pulpe dentaire capable de sécréter une matrice dentinaire *in vivo* et *in vitro*.

Notons qu'à l'aide d'anticorps monoclonaux, la présence de STRO-1 (marqueur des cellules souches de la moelle osseuse) dans la pulpe dentaire a été démontré à la surface d'environ 6% des cellules de la pulpe dentaire en culture, sur des cellules situées à proximité des vaisseaux sanguins (SHI et GRONTHOS, 2003) Une colocalisation de STRO-1 et de CD146 dans le

tissu pulpaire concorde avec le fait que les cellules souches résideraient dans une niche périvasculaire (SHI et GRONTHOS, 2003).

IV.1.2.1.2. Isolation des cellules souches de la pulpe dentaire à l'aide d'un colorant lié à l'ADN.

Il existe une technique qui consiste à isoler des cellules SP (*Side Population*) à l'aide d'un colorant fluorescent Hoechst 33342 lié à l'ADN (IOHARA *et al.*, 2006).

Ces cellules ont été isolées dans de nombreux tissus contenant des cellules souches mésenchymateuses chez les mammifères et elles possèdent un potentiel d'autorenouvellement. Par ailleurs la population SP présente comme marqueurs membranaires les récepteurs de la famille des SLAM, le CD150, le CD244, le CD48. L'hybridation *in situ* et la microscopie électronique ont permis de localiser certains marqueurs des cellules SP (CD31, Vegfr2, et BCRP1) dans la région périvasculaire de la pulpe dentaire.

L'absence des marqueurs des péricytes sur cette population cellulaire montre que ces cellules souches ne sont pas les mêmes que les DPSCs isolées par GRONTHOS.

Les cellules SP ont été mises en culture avec des BMP-2 (*Bone Morphogenetic protein 2*). Une analyse quantitative par RT-PCR a montré une augmentation significative de l'expression du collagène de type I, de la DSPP et de l'enamelysin par rapport aux groupes contrôles cultivés sans BMP-2 (Figure 9). Ces résultats montrent qu'un supplément en BMP-2 permet la différenciation des cellules SP en odontoblastes.

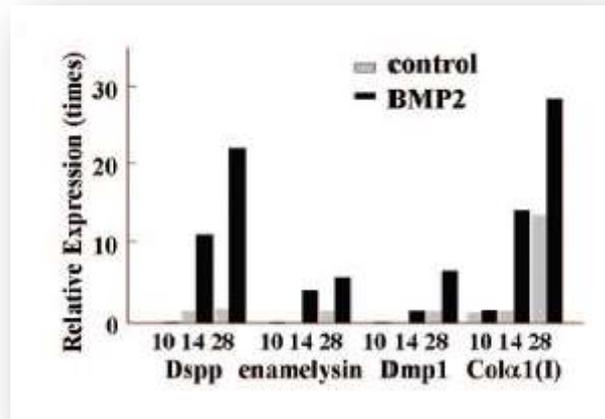


Figure 9 : Analyse par RT-PCR de l'expression de la Dspp, de l'énamelysin, de la Dmp1 et de l' $\alpha 1$ (I) collagène dans les cultures cellulaires traitées au BMP2 versus les cultures cellulaires sans BMP2. (IOHARA *et al.* 2006 []).

Les cellules SP seraient donc des progéniteurs des cellules odontoblast-like et pourraient se différencier en odontoblast-like dans le cas de coiffage direct pour induire la dentinogénèse de réparation. Par ailleurs, les cellules SP constitueraient une autre niche de cellules progénitrices.

IV.1.2.2. CAPACITE DE DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES DE LA PULPE DENTAIRE.

Les cellules souches de la pulpe dentaire peuvent se différencier en d'autres types cellulaires que les odontoblastes et donc possèdent la capacité d'acquérir d'autres voies de différenciation.

La différenciation peut être ostéoblastique.

Les cellules pulpaire SP mises en culture dans un milieu inducteur spécifique de la différenciation ostéoblastique ont la capacité de se différencier en ostéoblastes (IOHARA *et al.*, 2006)

La différenciation peut être adipogénique.

GRONTHOS *et al.* (2002) a mis les DPSCs CD146 en culture pendant cinq semaines dans un milieu contenant de l'isobutylmethylxanthine, de l'hydrocortisone et de l'indométhacine ; ces trois éléments induisant l'adipogénèse. Ils ont alors observés des agglutinations de gouttelettes lipidiques à l'Oil red O. Ils ont montré la capacité de différenciation adipocytaire des DPSCs grâce à la RT-PCR qui a mis en évidence deux transcrits spécifiques des adipocytes : la PPAR γ 2 (peroxysome proliferator-activated receptor γ 2) et la lipoprotéine lipase (LPL). Notons que normalement il n'existe pas d'adipocyte dans la pulpe dentaire.

De même, la coloration à l'Oil red O est intense pour les cellules SP mise en culture avec un milieu adipogénique (IOHARA *et al.*, 2006).

YANG et ses collaborateurs (2007) ont à l'aide d'un milieu inducteur spécifique engendré la différenciation adipogénique des DPSCs STRO-1+.

La différenciation peut être neuronale.

Des cellules CD146 de la pulpe de dents temporaires transplantées dans le cerveau d'une souris immunodéprimée se sont différenciées et ont exprimées à leur surface certains marqueurs spécifiques des cellules neuronales (MIURA *et al.*, 2003).

Par ailleurs, l'expression d'ARN messagers codant pour la neuromoduline et un neurofilament a été détecté dans les cellules SP cultivées dans un milieu neurogénique (IOHARA *et al.*, 2006).

YANG et ses collaborateurs (2007) ont à l'aide d'un milieu inducteur spécifique engendré la différenciation neurogénique de DPSCs STRO-1+.

La différenciation peut être chondrogénique.

L'induction chondrogénique a été mise en évidence par ALLIOT-LICHT *et al.* (2006). Ainsi, la coloration au bleu Alcian (coloration permettant de déterminer la présence de glycosaminoglycanes sulfatés caractéristiques de la matrice extracellulaire chondrogénique) est intense dans les nodules de cellules pulpaires CD146 cultivées *in vitro* en présence d'un milieu chondrogénique. D'autre part, l'analyse par RT-PCR montre l'expression d'ARN messagers codant pour des protéines caractéristiques des chondrocytes (le collagène II et le collagène X).

De même, 30% des cellules SP mises en culture dans un milieu chondrogénique se sont différenciées en chondrocytes (IOHARA *et al.*, 2006) et les cellules DPSCs STRO-1+ se sont différenciées en chondrocytes à l'aide d'un milieu inducteur spécifique (YANG *et al.*, 2007)

Ces résultats montrent que les cellules souches de la pulpe dentaire ont la capacité de donner plusieurs phénotypes cellulaires, caractéristique similaire aux autres populations de cellules souches.

Toutes ces études montrent la présence de cellules souches dans la pulpe dentaire. Ces cellules peuvent être isolées, amplifiées en culture et induites, soit en odontoblastes, soit en d'autres types cellulaires. Ces cellules sont ainsi des progéniteurs d'odontoblastes-like capables de générer après différenciation un pont dentinaire lors d'exposition pulpaire.

IV.1.3. DIVERSITE DE LA REPONSE REPARATRICE.

Les cellules souches issues des dents sont un formidable réservoir pour la régénération dentinaire. Utilisées en application clinique, elles offriraient de nouvelles perspectives thérapeutiques en odontologie.

La dentine de réparation peut prendre divers aspects allant d'un aspect tubulaire régulier ressemblant à la dentine physiologique primaire, à un aspect atubulaire ayant peu de points

communs avec l'apparence normale de la dentine. Une telle diversité de structure amène à se poser des questions sur la spécificité de la réparation dentinaire (SLOAN et SMITH, 2007).

Le développement dentaire comprend une série d'interactions épithélio-mésenchymateuses parfaitement orchestrées ; ce qui conduit à la structure de l'organe dentaire (SLOAN et SMITH, 2007). Pendant le processus de réparation dentinaire, ces mécanismes de régulation sont absents. De plus, la libération des molécules biologiques se fait de manière anarchique lors de la lésion pulpaire (SLOAN et SMITH, 2007). Par ailleurs, plusieurs niches de cellules souches sont susceptibles d'être recrutées pour la sécrétion dentinaire (SLOAN et SMITH, 2007).

Tous ces éléments aboutissent à la diversité de la réponse réparatrice observée.

La synthèse de dentine de réparation est un processus biologique extrêmement complexe qui requiert la présence de progéniteurs qui vont proliférer, migrer et se différencier au niveau du site lésé.

Une connaissance plus approfondie des propriétés des cellules souches dentaires permettra de savoir les conditions fondamentales nécessaires au maintien et à la croissance *in vivo* des populations cellulaires primitives, afin de diriger et d'améliorer leur potentiel de développement pour des stratégies d'ingénierie tissulaire et de thérapie génique.

IV.2. LE PROCESSUS DE REPARATION ET SES ANALOGIES AVEC LES PREMIERES ETAPES DE FORMATION DE LA DENT.

L'étude du développement de la dent permet de comprendre les événements de régulation embryogénique. Les résultats de ces analyses montrent beaucoup de similitudes avec le processus de régénération tissulaire qui se produit lors d'une atteinte pulpaire.

Une comparaison de la dentinogénèse et du processus de réparation permet de mieux appréhender les évènements moléculaires et cellulaires qui se produisent lors de la régénération et d'ainsi élaborer des stratégies thérapeutiques permettant d'induire la réparation du complexe pulpodentinaire endommagé.

Nous allons donc rappeler brièvement le mode de différenciation odontoblastique lors de la formation de la dent, puis relever dans un second temps les analogies avec la dentinogénèse de réparation.

IV.2.1. LA DIFFERENCIATION DES ODONTOBLASTES LORS DU DEVELOPPEMENT DENTAIRE.

Les odontoblastes, cellules postmitotiques, allongées et polarisées secrètent les composants de la dentine.

Les mécanismes de contrôle de la différenciation terminale de ces cellules sont complexes. En effet, les préodontoblastes de la pulpe dentaire isolés et cultivés *in vitro* dans des conditions standards ou greffés *in vivo* ne donnent jamais naissance à des odontoblastes fonctionnels. La différenciation terminale de ces cellules requiert un contrôle épigénétique assuré par des interactions épithélio-mésenchymateuses spécifiques. Seules les cellules en contact avec la membrane basale se différencient en odontoblastes fonctionnels ; c'est ce qui a été décrit dans la première partie.

Cette différenciation est possible grâce à la sécrétion de facteurs de croissance TGF β -1,-2,-3, BMP-2,-4,-7. Cette sécrétion, assurée par les préaméloblastes, interagit avec certains éléments de la membrane basale et vont être ensuite présentés aux préodontoblastes compétents (Figure 10). La membrane basale opérationnelle agit à la fois en tant que substrat et en tant que réservoir de facteurs paracrines. Il s'en suit une cascade de réaction notamment la synthèse de TGF β s autocrines qui stimulent la synthèse de fibronectine par les odontoblastes (RUCH dans le livre PIETTE et GOLDBERG, 2001). Les TGF β autocrines régulent la synthèse des composants organiques de la pré-dentine. La fibronectine (FN) interagit avec la protéine

165kDa. Le complexe FN-165kDa transmet des signaux contrôlant la réorganisation du cytosquelette conduisant à la polarisation des odontoblastes (Figure 10) (RUCH dans le livre PIETTE et GOLDBERG, 2001 []).

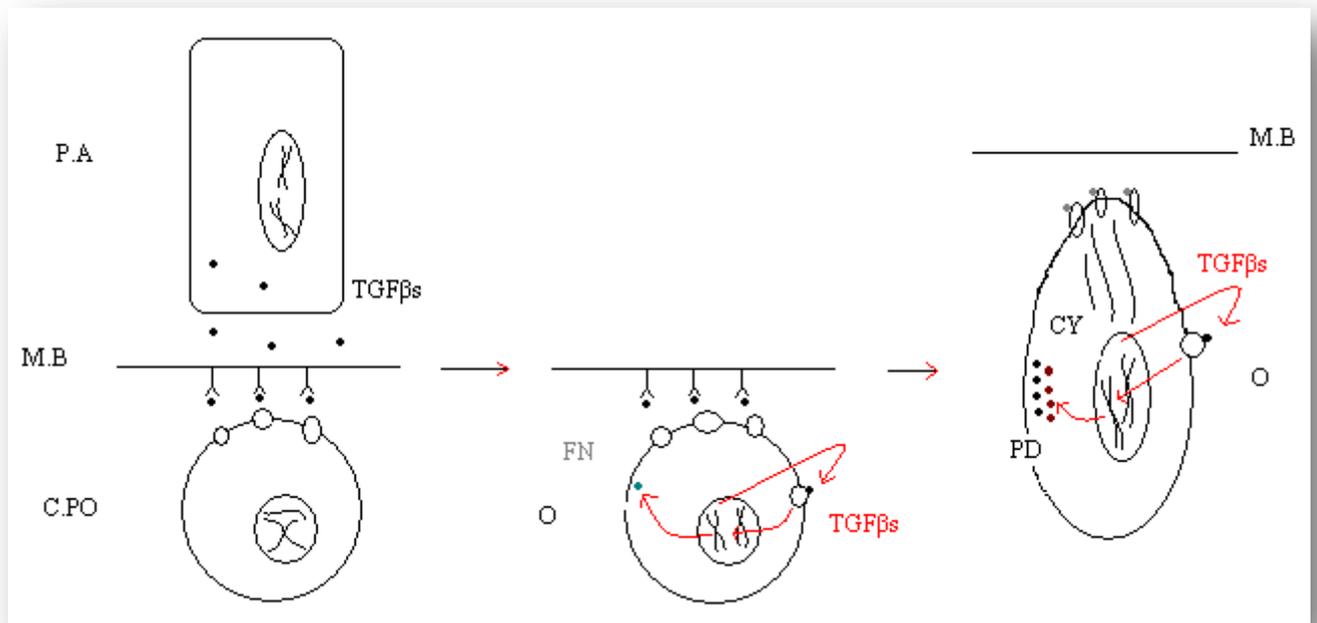


Figure 10 : Schéma montrant le contrôle de la différenciation des odontoblastes. (P.A : préaméloblaste, B.M : Membrane basale, C.PO : préodontoblaste compétent, O : odontoblaste, FN : fibronectine, PD : prédentine, CY : cytosquelette). D'après RUCH dans le livre PIETTE et GOLDBERG, 2001.

Par ailleurs, plusieurs molécules interviennent pendant les phénomènes de différenciation et qui ne sont par suite plus rencontrées dans la dent adulte.

Ainsi, le récepteur transmembranaire Notch est exprimé dans les cellules de la couche sous-odontoblastique et le récepteur Delta1 dans les odontoblastes différenciés pendant la dentinogénèse primaire. Delta1 et Notch ont des expressions complémentaires et ont une fonction d'inhibition de la différenciation, ainsi ils maintiennent les cellules de Höhl dans un stade indifférent. Cela suggère le rôle de ces molécules dans le contrôle de la différenciation odontoblastique (MITSIADIS et RAHIOTIS, 2004).

Les récepteurs Notch influencent la différenciation, la prolifération et les évènements apoptotiques (MITSIADIS et RAHIOTIS, 2004).

Des glycoprotéines de surface, les N-cadhérines et des gaps jonctions, la connexine 43 (Cox 43) interviennent aussi pendant le dentinogénèse primaire (MITSIADIS et RAHIOTIS, 2004). La cadhérine est impliquée dans l'adhésion cellulaire, la reconnaissance cellulaire, le contrôle des divisions cellulaires, la migration et la différenciation. La cox43 est quant à elle impliquée dans la communication intercellulaire permettant les échanges d'ions et de molécules.

Quels sont maintenant les signaux qui permettent le recrutement des cellules souches lors d'une lésion pulpaire ?

IV.2.2. LES SIGNAUX INFLUENÇANT LE RECRUTEMENT ET LA DIFFERENCIATION DES CELLULES PULPAIRES PENDANT LA DENTINOGENESE DE REPARATION.

Durant le processus de réparation, il n'y a pas de membrane basale permettant de présenter les molécules biologiques nécessaires à la différenciation odontoblastique. La présence de la matrice dentinaire au niveau du site lésé jouerait le rôle de cette membrane basale et permettrait la présentation des signaux inducteurs (SMITH et LESOT, 2001).

Lors de la formation de la dent, des facteurs de croissance (TGF- β , BMPs, IGFs) sont secrétés et capturés par la matrice dentinaire qui devient alors un véritable réservoir biologique. Ces molécules sont ensuite libérées lors d'une déminéralisation de la dent et activent la différenciation odontoblastique.

L'induction de dentine de réparation a été étudiée *in vivo* sur des modèles animaux. En effet, quand des fragments dentinaires sont implantés au niveau de la pulpe exposée lors de préparation cavitaire, on observe une réponse réparatrice (TZIAFAS *et al.*, 2000).

Les facteurs de croissance ne sont pas les seuls éléments qui interviennent durant la dentinogénèse de réparation.

Des gènes précoces c-jun et b-jun sont up-régulés pendant la réparation dentinaire. Ces proto-oncogènes sont exprimés pendant la formation de la dent (KITAMURA *et al.*, 1999). Ces gènes précoces stimulés lors de la blessure agissent comme des activateurs de la division cellulaire pour aider à la cicatrisation des tissus adjacents qui ont souffert de la perte de cellules.

Les protéines Notch, cadhérine et connexine décrites précédemment, sont aussi impliquées dans ce processus dynamique qui suit la lésion pulpaire et sont impliquées dans la cascade de signaux qui permettent la différenciation des cellules souches pulpaires (ABOUT *et al.*, 2000 ; HEYMANN *et al.*, 2002 ; MITSIADIS et RAHIOTIS., 2004).

Il existe donc une analogie de la réponse réparatrice avec la dentinogénèse initiale. La réexpression de ces molécules sur la pulpe lésée pourrait aider à coordonner les comportements cellulaires comme la prolifération, la migration et l'activité de différenciation des cellules souches pulpaires.

Prendre en compte les similitudes et les différences moléculaires entre le développement et la réparation pourraient aider au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques biologiques pour la réparation des tissus dentaires en clinique.

IV.3. LES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES.

Actuellement, la reconstitution de dentine détruite repose sur l'utilisation de matériaux de restauration qui ne remplace pas la structure et la fonction normale des tissus perdus. Ces thérapeutiques dans un grand nombre de cas, aboutissent au traitement endodontique.

La capacité de régénération du complexe pulpodentinaire à partir des cellules souches pulpaire pourrait être utilisée dans une approche d'ingénierie tissulaire.

De plus en plus de recherches s'orientent vers leur utilisation. Lors d'une atteinte carieuse ou traumatique atteignant la pulpe dentaire, les cellules souches de la pulpe dentaire seraient induites pour permettre leur différenciation odontoblastique et créer de la dentine de réparation.

C'est ce que nous allons voir en détail dans notre dernière partie sur les thérapies pulpaire de demain.

V. THERAPEUTIQUES PULPAIRES DE DEMAIN.

V. 1. INGENIERIE TISSULAIRE.

V.1.1. DEFINITION.

L'ingénierie tissulaire est une science interdisciplinaire qui traite de la régénération ou de la réparation des tissus traumatisés ou endommagés par des cancers, des traumatismes, des maladies (NAKASHIMA et AKAMINE, 2005).

La régénération des tissus inclue :

- L'utilisation de vecteurs en trois dimensions qui permettent de créer un microenvironnement facilitant la formation d'un nouveau tissu.
- Des stratégies inductives dans lesquelles une molécule biologiquement active est ajoutée dans le vecteur pour modifier le comportement cellulaire.
- Des cellules souches qui, suite à ces stratégies inductives, se différencient dans le type cellulaire souhaité (EDWARDS et MASON, 2006 []).

Trois éléments clés sont donc essentiels à cette science :

- Les cellules souches.

- Les vecteurs.
- Les morphogènes/ molécules bioactives.

V.1.2. LES MOYENS.

V.1.2.1. LES CELLULES SOUCHES.

Nous avons décrit dans la partie IV leurs caractéristiques, ainsi que les différentes niches de cellules souches présentes au sein de la pulpe dentaire.

De nombreux articles publiés au cours de ces dernières années montrent l'intérêt grandissant portées à ces cellules et à leur utilisation potentielle en odontologie.

Des cellules souches issues de sites non dentaires pourraient être utilisées. Une population de BMCs (Bone Marrow Cells) enrichie en c-kit⁺ a récemment été analysée. Ils ont ainsi sélectionné des cellules souches capables de se différencier en odontoblastes dans un modèle expérimental de dent en développement (HU *et al.*, 2006).

YU et ses collaborateurs (2007) ont mis en culture les BMSSCs (*Bone Marrow Stromal Stem Cells*) *in vitro* mixées avec de l'ABC (*Apical Bud Cells*, cellules épithéliales situées à proximité de la zone de réflexion de la dent) et ont relevé par RT-PCR l'expression du gène DSPP. Ils ont ainsi mis en évidence la capacité de différenciation odontogénique de cellules souches de la moelle osseuse (BMSSCs, *Bone Marrow Stromal Stem Cells*), le gène DSPP étant un marqueur du phénotype odontoblastique.

V.1.2.2. LES VECTEURS.

Les vecteurs fournissent un environnement physicochimique et biologique favorable à la croissance et à la différenciation cellulaire en favorisant l'adhésion et la migration cellulaire.

Ils servent ainsi de transporteurs pour des morphogènes ou pour des cellules.

Les vecteurs doivent être efficaces dans le transport de nutriments et d'oxygène.

Ils doivent pouvoir être dégradés et remplacés par un tissu de régénération et ainsi être biocompatibles et non toxiques (NAKASHIMA et AKAMINE, 2005).

Les vecteurs les plus couramment utilisés sont le PLA (le polyacide lactique), le PGA (l'acide polyglycolique) et leur copolymère, le PLGA (l'acide polylactique glycolique).

Les hydrogels synthétiques comprennent les PEG (le polyéthylène glycol) à base de polymères modifiés à l'aide de peptides d'adhésion de la surface cellulaire comme l'arginine, la glycine et l'acide aspartique (le motif RGD), qui améliore l'adhésion cellulaire et la synthèse de matrice extracellulaire. Enfin, les vecteurs contenant des composants inorganiques comme l'hydroxyapatite ou d'autres phosphates de calcium peuvent être utilisés (NAKASHIMA et AKAMINE, 2005).

Lors de la dentinogénèse de réparation, une première vague de cellules souches pulpaire adhère à la zone de nécrose pulpaire générée par l'hydroxyde de calcium, puis une deuxième vague de cellules souches pulpaire adhère à l'ostéodentine avant de se différencier en odontoblastes-like pour former de la dentine tubulaire (PIETTE et GOLDBERG, 2001).

Une amélioration de la dentinogénèse de réparation serait donc :

- Soit, grâce à un vecteur, d'amener des cellules souches au contact direct de la pulpe exposée pour induire la formation de dentine tubulaire.
- Soit de créer un environnement favorable à la différenciation des précurseurs odontoblast-like pulpaire pour induire la formation de dentine tubulaire.

V.1.2.3. LES MOLECULES BIOACTIVES.

Les morphogènes sont des signaux inducteurs dont la fonction est la croissance/différenciation des cellules (NAKASHIMA et AKAMINE, 2005).

Il existe de nombreuses macromolécules biologiques impliquées dans le « signalement » de la réponse réparatrice pulpaire lors de coiffage direct. Ces molécules offrent d'excellentes opportunités pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques en dentisterie restauratrice (GOLDBERG *et al.*, 2004). Ces molécules sont les facteurs de croissance, les protéines de la matrice dentinaire ou les molécules de la matrice extracellulaire.

Nous allons donc exposer leurs effets sur l'induction de la dentinogénèse de réparation dans le prochain chapitre.

Précisons que les mécanismes régissant la transition entre la cellule souche pulpaire et la cellule odontoblastique, c'est-à-dire la prolifération, la migration, la différenciation et la sécrétion de la matrice extracellulaire pendant la blessure pulpaire, ne sont pas encore élucidés (NAKASHIMA et AKAMINE, 2005).

V.1.3. LES TECHNIQUES.

Les modèles animaux les plus couramment utilisés pour examiner les effets des différents agents de coiffage sur la dent sont le chien, le singe, le furet, le rat et le lapin (EDWARDS et MASON, 2006). Précisons que le lapin et le rat ont des dents qui sont en continuelle éruption et qui présentent un foramen apical ouvert. Ces derniers modèles ont donc une capacité inhérente à la réparation et présentent donc des similarités avec les dents temporaires et les dents permanentes immatures humaines. D'un autre côté, ce sont de bons modèles pour l'étude de la différenciation des progéniteurs pulpaires (EDWARD et MASON, 2006).

Le protocole expérimental le plus répandu est la création mécanique d'une exposition pulpaire. Cependant cette technique ne permet pas de reproduire ce qui se passe dans le scénario clinique habituel où le complexe pulpodentinaire est détruit par l'inflammation résultant de l'attaque bactérienne d'origine carieuse (EDWARD et MASON, 2006).

C'est pour cela que certains modèles ont été développés en reproduisant l'inflammation pulpaire par l'injection de lipopolysaccharide bactérien (RUTHERFORD, 2001).

Il existe deux méthodes principales pour induire la formation de dentine de réparation : les méthodes *in vivo* et *ex vivo* (RENARD *et al.*, 2007).

V.2. TECHNIQUES IN VIVO.

La méthode *in vivo* comprend deux techniques distinctes : la technique par application directe de molécules bioactives sur la pulpe dentaire *in vivo* ou la technique par thérapie génique *in vivo*.

V.2.1. APPLICATION DIRECTE DE MOLECULES BIOACTIVES.

Le phénomène de cicatrisation de la pulpe dentaire peut être induit par l'application directe de molécules bioactives grâce à des vecteurs.

V.2.1.1. APPLICATION DIRECTE DE FACTEURS DE CROISSANCE.

V.2.1.1.1. Rappels sur les facteurs de croissance.

Les facteurs de croissance sont des peptides qui permettent la transmission de signaux entre les cellules ; ils fonctionnent soit en inhibant soit en stimulant la croissance cellulaire ; et donc ils interviennent dans la modulation de la différenciation cellulaire.

Ils agissent de manière endocrine, autocrine, paracrine, juxtacrine ou intracrine ce qui met en lumière la complexité de l'activité du contrôle cellulaire. Ils agissent par l'intermédiaire de récepteurs entraînant une chaîne de réaction intracellulaire, induisant des signaux dans le noyau cellulaire. Ceci conduit à l'expression de gènes et à la transcription de facteurs modifiant le comportement de la cellule (SMITH, 2003).

Les facteurs de croissance sont un groupe clé de molécules responsables de la signalisation cellulaire lors de la dentinogénèse de réparation.

Plusieurs sortes de facteurs ont été testées pour induire la formation de dentine de réparation lors d'une blessure pulpaire, en particulier ceux de la famille des Transforming Growth Factors- β qui apparaissent comme étant importants dans la signalisation de la différenciation odontoblastique (SMITH, 2003).

Des études expérimentales ont été menées pour induire la formation de dentine de réparation à l'aide de l'application directe de TGF β 1 et de BMP-7.

V.2.1.1.2. Application de TGF β 1.

Les Transforming Growth Factors β s forment un groupe de protéines ubiquitaires qui jouent un rôle central dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la sécrétion hormonale et la fonction immune. Le TGF β comprend trois isoformes similaires : le TGF β 1, le TGF β 2, et le TGF β 3. Dans la dent humaine, les odontoblastes expriment les trois isoformes. Cependant, seulement le TGF β 1 est séquestré dans la matrice dentinaire (CASSIDY *et al.*, 1997).

Le TGF β 1 apparaît comme étant un signal important dans la différenciation des odontoblastes-like. En effet, il a été montré *in vitro* que le TGF β pouvait directement induire la différenciation des cellules souches et up-réguler la sécrétion des composants matriciels du complexe dentinaire (DOBIE *et al.*, 2002).

Quand n'est – il de son application directe sur des pulpes exposées ?

Une étude de NAKASHIMA (1994), a montré une inhibition de la formation de dentine de réparation après un coiffage direct de pulpes avec du collagène contenant du TGF β 1.

Plus récemment, TZIAFAS (2001), a procédé à une étude expérimentale *in vivo* sur des pulpes dentaires de 6 chiens âgés de 12 à 18 mois. Des cavités de classe V ont été réalisées sur des molaires, canines et incisives, puis ces cavités ont été coiffées à l'aide de TGF β 1 porté par quatre vecteurs différents.

Pour ce faire, quatre groupes ont été constitués :

- Groupe 1 : 14 dents coiffées de filtres Millipore.
- Groupe 2 : 14 dents coiffées de granules poreux d'hydroxyapatite.
- Groupe 3 : 20 dents coiffées de cônes de titane mesurant 3mm de diamètre sur 2mm de long.
- Groupe 4 : 14 dents coiffées de cônes mesurant 3mm de diamètre sur 3 mm de long fabriqués à l'aide de ciment d'hydroxyde de calcium.

Chaque matériau de coiffage a été enrobé de solution contenant de l'albumine seule pour les échantillons contrôles et de l'albumine associée aux molécules de TGF β 1 recombinant pour les échantillons tests.

Les réactions du tissu pulpaire ont été observées au microscope optique après 3 semaines et pour les cônes de titanes un examen au microscope à balayage a été effectué.

Seules les dents coiffées à l'aide des cônes d'hydroxyde de calcium enrobés de molécules de TGF β 1 recombinant présentent la formation de dentine de réparation sous forme de fine barrière minéralisée avec la présence de longues cellules polarisées. L'examen des cônes de titane retirés des dents après trois semaines ne montre aucun dépôt de matrice dentinaire à leur surface.

TZIAFAS (2001) conclue que les vecteurs contenant le TGF β 1 n'ont pas d'effet stimulateur sur la synthèse de dentine de réparation dans les coiffages directs, mis à part le vecteur contenant l'hydroxyde de calcium. Le TGF β 1 pourtant impliqué dans la différenciation odontoblastique, ne semble pas agir lors d'une large blessure et appliqué directement au

contact de la pulpe. Par contre, TZIAFAS (2001) précise que les propriétés physico-chimiques et biologiques de la surface spécifique du ciment d'hydroxyde de calcium améliorent l'effet anabolisant du TGF β 1. Il conclue par le fait que d'autres études doivent être effectuées pour connaître les effets doses dépendant du TGF β 1.

Une autre étude expérimentale *in vivo*, sur des dents de chèvres, a été menée (ZHANG *et al.* 2007). Le but de cette étude est d'évaluer l'effet d'un matériau de phosphate de calcium (CaP) appliqué en coiffage direct à l'aide d'un vecteur PLGA (acide polylactique glycolique) sous forme de microsphères et de mesurer la taille du pont dentinaire obtenu en utilisant différentes concentrations de TGF β 1.

L'auteur justifie l'utilisation de phosphate de calcium à l'aide d'une étude qui montre qu'une alternative à l'hydroxyde de calcium est le ciment de phosphate de calcium qui présente les mêmes capacités de biocompatibilité et le potentiel de stimuler l'ostéogenèse (CHAUNG *et al.*, 1996; JEAN *et al.*, 1988).

Quatre groupes ont été constitués :

- Groupe 1 : 6 dents coiffées de PLGA/CaP et TGF β 1 (haute concentration, 400ng/dent).
- Groupe 2 : 6 dents coiffées de PLGA/CaP et TGF β 1 (basse concentration, 20ng/dent).
- Groupe 3, contrôle : 6 dents coiffées de PLGA/CaP et 0,1% BSA (albumine de sérum de bovin).
- Groupe 4, contrôle négatif : 6 dents avec aucun coiffage.

Les échantillons ont été analysés en microscopie optique 12 semaines après le coiffage pulpaire.

Un pont dentinaire complet a été observé seulement dans les échantillons du groupe PLGA/CaP et TGF β 1 en haute concentration. De plus, la formation de pont dentinaire dans le groupe PLGA/CaP et TGF β 1 en faible concentration est identique à celle du groupe 3 contrôle. Aucune barrière minéralisée n'a été trouvée dans le groupe 4. L'analyse statistique montre une différence significative entre les dents coiffées de TGF β 1 en haute concentration versus les autres groupes. Aucune différence n'existe entre les échantillons du groupe 2 et 3.

Cette étude montre deux choses : la première est que l'utilisation de PLGA/CaP en coiffage direct engendre la formation de pont dentinaire, la seconde est que le processus est considérablement augmenté par l'adjonction de 400ng de TGF β 1. Ce matériau pourrait être un bon candidat pour les thérapies pulpaires sur dent vitale, mais d'après les auteurs, il est nécessaire d'améliorer la production et la manipulation par d'autres études (ZHANG *et al.*, 2007).

Le TGF β 1, à la lumière de ces études, apparaît comme efficace dans l'induction de la dentinogénèse de réparation quand il est associé à un matériau stimulant la minéralisation pulpaire (ZHANG *et al.*, 2007) Appliqué seul sur une pulpe exposée il ne paraît pas engendrer de pont dentinaire (NAKASHIMA, 1994; TZIAFAS, 2001).

V.2.1.1.3. Application de Bone Morphogenetic Protein-7(Osteogenic protein-1).

La BMP-7 fait partie de la famille des *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs).

Les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) sont des membres de la super famille des *Transforming Growth Factors*. Il existe 14 types de BMPs. Les effets des BMPs ont été rapportés sur le recrutement et la différenciation des cellules ostéogéniques, et sur la minéralisation ectopique donc dans des sites d'implantation qui habituellement ne se minéralisent pas (SAMPATH *et al.*, 1992).

La pulpe possède les gènes des BMPs ainsi que les récepteurs des BMPs : les BMPs sont impliquées dans le développement dentaire.

La BMP-7 a été utilisé comme agent de coiffage direct de pulpes dentaires sur modèles animaux pour induire de la dentine de réparation par de nombreux auteurs (RUTHERFORD, 2001; SIX *et al.*, 2002).

Une étude de Six *et al.* (2002) a montré les effets de la BMP-7 sur la dentinogenèse de réparation sur un modèle expérimental animal : la première molaire maxillaire du rat.

Après l'implantation de la BMP-7 (1,3, ou 10µg de BMP-7 recombinant par implant) mixée avec des petits amas de collagène, un processus inflammatoire de la pulpe est toujours observé un mois après l'implantation. Cependant, la partie mésiale de la pulpe coronaire est comblée d'ostéodentine hétérogène. Par contre, la partie mésiale de la racine est comblée d'un matériau dense et homogène sous une ligne calcio-traumatique.

La BMP-7 paraît être efficace dans la formation de pont dentinaire lors d'exposition pulpaire.

Pourquoi une telle différence entre la partie radiculaire et coronaire ?

La partie coronaire d'une dent est constituée d'une couche superficielle d'émail, d'une dentine formée d'abord au stade pré-éruptif sous l'influence de l'organe de l'émail, puis d'une dentine circumpulpaire. Les tissus présents dans la racine sont limités par plusieurs couches de ciments, servant à l'ancrage de la dent dans l'alvéole osseuse (GOLDBERG *et al.*, 2001).

La dentine et la pulpe radiculaire se sont formées initialement grâce à la gaine épithéliale de Hertwig (GOLDBERG *et al.*, 2001). Les interactions épithélio-mésenchymateuses intervenant au cours de la formation initiale des tissus dentinaires coronaires et radiculaires sont donc de nature différente. Plus tardivement, l'angiogénèse et la neurogénèse sont également spécifiques. Cela pourrait éclairer les différences de réaction ou de cible que les auteurs observent en réponse aux implantations de molécules bioactives (GOLDBERG *et al.*, 2001). De plus, ces spécificités permettent d'envisager des stratégies distinctes répondant à des cibles thérapeutiques différentes (GOLDBERG *et al.*, 2001).

V.2.2.2. APPLICATION DIRECTE DE PROTEINES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DENTINAIRE.

Quand des fragments de matrice dentinaire sont placés au contact d'une pulpe dentaire exposée, on observe une réponse réparatrice (TZIAFAS, 2001). C'est pour ce fait que certains composants de la matrice dentinaire ont été testés expérimentalement comme agents de coiffage direct.

V.2.2.2.1. Application de la sialoprotéine osseuse (la BSP).

Parmi les molécules de la matrice extracellulaire dentinaire qui paraissent présenter des propriétés biologiques intrinsèques pour promouvoir la régénération dentinaire, la sialoprotéine osseuse (la BSP) est une bonne candidate (GOLDBERG *et al.*, 2006). La BSP est exprimée par les odontoblastes.

C'est une molécule de 57kDa, présente dans l'os et dans la dentine, dont le squelette protéique est de 33,6 kDa. Sa teneur en acide sialique varie selon les espèces. Cette molécule phosphorylée présente des triplets d'adhésion RGD (arginine, glycine, aspartate). Des motifs répétitifs d'acide polyglutamique peuvent se lier à l'hydroxyapatite et sont susceptibles de servir de « nucléateur » et de « patron » au cristallite ceci a été montré *in vitro* (GOLDBERG *et al.*, 2001). La BSP peut aussi contribuer à favoriser la croissance des cristallites et la fibrillation du collagène (GOLDBERG *et al.* 2001, []). Enfin, implantée en site osseux, dans des lésions de l'os préparées à l'aide d'un trépan, lésions dont le diamètre est suffisamment large pour ne pas guérir spontanément, la BSP provoque le recrutement de cellules indifférenciées et leur différenciation directe en ostéoblastes, sans passer par le stade chondrocyte (donc il s'agit d'une ossification de type os de membrane) (GOLDBERG *et al.*, 2001).

GOLDBERG et ses collaborateurs (2001) ont étudié les effets de la BSP lors d'un coiffage pulpaire direct *in vivo* sur des molaires de rats âgés de 6 à 7 semaines. Quatre groupes ont été constitués :

- Groupe 1 : témoin où aucun coiffage n'a été pratiqué.
- Groupe 2 : coiffage avec le vecteur seul (gélatine) pour évaluer les effets de l'inflammation induite par l'implantation de ce support.
- Groupe 3 : Groupe expérimental recevant la molécule bioactive (1,6µg de BSP par dent) implantée avec le vecteur de gélatine
- Groupe 4 : coiffage à l'hydroxyde de calcium à titre de comparaison.

Immédiatement après leur préparation, les cavités ont été obturées par un ciment verre ionomère (GOLDBERG *et al.* 2001).

Chaque groupe est divisé en trois sous groupes de six rats. Les rats inclus dans chacun de ces sous groupes étant sacrifiés respectivement au bout de 8 jours, 14 jours et 28 jours. Les préparations histologiques conventionnelles ont été réalisées puis observées au microscope photonique.

L'hydroxyde de calcium induit en huit jours la formation initiale d'un pont dentinaire qui s'épaissit au bout de 14 jours (Figure 11) ce qui est conforme au pont dentinaire décrit dans la partie III.2.5.1. Après 28 jours, sous cette masse d'ostéodentine, il reste des résidus hétérogènes de pulpe, entre les masses de globules de tailles diverses et mal fusionnés. La BSP, quant à elle, 14 jours après l'implantation, provoque la formation d'une masse minéralisée, englobant les débris dentinaires. Au bout de 28 jours, la partie mésiale de la chambre pulpaire est complètement minéralisée (Figure 12). La dentine réparatrice est homogène et ne comporte pas d'inclusion cellulaire.



Figure 11 : Formation d'un pont dentinaire au bout de 14 jours par l'hydroxyde de calcium (têtes de flèches). Ces processus de formation de dentine réparatrice sont accompagnés de calcosphérites au niveau de l'isthme situé entre les parties mésiale et centrale de la pulpe (astérisques). Ces structures peu à peu comblent la partie mésiale de la pulpe. D'après GOLDBERG *et al.*, 2001.



Figure 12 : Implantation de la BSP à 28 jours. Sous une couche superficielle d'ostéodentine, une dentine réparatrice s'est formée, dense et homogène. D'après GOLDBERG *et al.*, 2001.

Avec la BSP, la masse comblant au bout d'un mois la partie mésiale de la pulpe est homogène. GOLDBERG et ses collaborateurs (2001) concluent que la BSP pourrait ainsi protéger la pulpe résiduelle de la cytotoxicité des monomères libres non polymérisés des résines de reconstitution coronaire. En effet, la dentine de réparation induite par la BSP est plus homogène que celle induite par l'hydroxyde de calcium et pourrait donc être plus efficace pour protéger la pulpe (GOLDBERG *et al.*, 2006)

V.2.2.2.2. Application de Dentonin, fragment de la MEPE (Matrix Extracellulaires Phosphoglycoprotein).

La MEPE, phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire, sécrétée par les odontoblastes, est aussi appelée l'OF45 (*osteoblast/osteocyte factor 45*).

C'est un membre des SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) ; groupe de protéines décrites dans notre partie II.1.2.1.2.

Dans les tissus dentaires, la MEPE est exprimée par les odontoblastes durant l'odontogénèse (MACDOUGALL *et al.*, 2002), mais est inhibée lors de la différenciation des DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*) (LIU *et al.*, 2005).

La portion centrale de la MEPE (résidus 242-264) inclue un triplet RGD (résidus 247-249), un attachement glycosamino-glyqué (résidus 256-259) et un motif de liaison du calcium.

Le peptide synthétique correspondant à cette portion centrale est nommé la Dentonin (SIX *et al.*, 2007). La Dentonin est un petit peptide de 23 résidus dérivé de la MEPE sans autre modification. Elle n'est pas phosphorylée mais possède des motifs RGD (arginine-glycine-aspartate) et SGD (sérine-glycine-aspartate-glycine). Elle est élaborée par voie de synthèse chimique standard ; elle est hautement soluble dans l'eau et donc facile à doser (SIX *et al.*, 2003).

La Dentonin améliore la prolifération des DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*) *in vitro* (LIU *et al.*, 2004).

L'application directe de la Dentonin *in vivo* sur des molaires de rats a été effectuée pour évaluer ses effets sur la réparation pulpaire (GOLDBERG *et al.*, 2006).

Les vecteurs utilisés sont des microbilles d'agarose (75-150 µm de diamètre) Affi-gel (Biorad, Hercules, California) solubles dans un milieu de culture aqueux et donc adaptés à la solubilité de la Dentonin.

Pour l'expérimentation, deux groupes ont été constitués :

- Un groupe expérimental comprenant des molaires coiffées de microbilles imprégnées de Dentonin et obturées au ciment verre ionomère.
- Un groupe contrôle comprenant des molaires coiffées de microbilles seules et obturées au ciment verre ionomère.

Après l'implantation des billes témoins, une réaction inflammatoire est observée au 8^{ème} jour mais ce phénomène est résolu au 90^{ème} jour. Des ponts dentinaires sont observée au 90^{ème} jour mais cette minéralisation est restreinte comparée aux effets des molécules bioactives.

Le recrutement initial des cellules pulpaire réparatrices s'avère rapide avec la Dentonin sur les microbilles d'agarose. En effet, 8 jours après l'implantation, des cellules de forme irrégulière sont observées autour des billes. Ces cellules contribuent probablement au processus de formation du pont dentinaire.

Après deux semaines, on observe la confluence de nodules minéralisés et la formation massive de dentine de réparation. La transformation de la partie mésiale de la pulpe coronaire en un tissu minéralisé homogène est ensuite ralentie après 15 jours. De tels phénomènes ne sont pas détectés dans la racine dentaire contrairement à la BMP-7.

Par conséquent, la Dentonin semble être une bonne candidate pour l'induction de la dentinogénèse de réparation (GOLDBERG *et al.*, 2006).

Une étude récente (SIX *et al.*, 2007), a analysé les effets de l'implantation de la Dentonin *in vivo* sur des molaires de rats de manière plus précise.

Des microbilles d'agarose imprégnées ou non de Dentonin ont été implantées dans des pulpes de molaires de rats. La réaction pulpaire est évaluée à 8, 15 et 30 jours après le coiffage.

A 8 jours, la Dentonin induit la prolifération des cellules pulpaire ; ceci étant visible grâce au marquage immunohistochimique au PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*).

Le marquage au RP59 (marqueur des progéniteurs ostéoblastiques impliqué dans le recrutement des ostéoblastes) montre la localisation des progéniteurs ostéoblastiques autour des billes d'agarose imprégnées de Dentonin.

Le marquage au PCNA et au RP59 décroît au 15^{ème} jour, alors que l'OPN (ostéopontine), en faible quantité au jour 8, augmente. L'ostéopontine est un marqueur des cellules ostéoblastiques.

La DSP (phosphoprotéine dentinaire) n'a jamais été détectée au cours de l'expérimentation : la Dentonin ne stimule pas les cellules de la lignée odontoblastique, mais bien les cellules de la lignée ostéoblastique.

Comme précédemment décrit dans les études de GOLDBERG *et al.* (2006), la formation de dentine de réparation apparaît précocement dans les pulpes coiffées avec des billes imprégnées de Dentonin (J8).

Ces résultats montrent que la Dentonin agit lors des premières étapes de la réparation dentinaire ; c'est-à-dire le recrutement, la prolifération et la différenciation précoce des progéniteurs « *osteoblast-like* ». De plus, la Dentonin exercerait peut être un contrôle négatif sur la différenciation terminale des cellules odontoblastes-like car il n'y a pas de formation de dentine tubulaire, ni de DSP (phosphoprotéine dentinaire) (Six *et al.*, 2007).

V.2.2.2.3. Application d'agents inducteurs de la chondrogénèse (CIA).

Deux polypeptides, issus de l'incisive de rat et de la matrice dentinaire de bovin, stimulent *in vitro* la différenciation des fibroblastes exprimant un phénotype chondrogénique (AMAR *et al.*, 1991)

Ces molécules issues de la matrice dentinaire sont deux produits issus d'un gène d'amélogénine de faible poids moléculaire identifié dans la librairie d'ADNc d'odontoblastes de l'incisive de rat (VEIS *et al.*, 2000).

Elles semblent être exprimées par les odontoblastes et ne semblent pas être des produits de dégradation issus de l'émail en formation (VEIS *et al.*, 2000). Elles résultent d'épissages alternatifs du gène de l'amélogénine (NEBGEN *et al.*, 1999).

Il y a donc :

- L'A+4 qui comprend les exons allant de 1 à 7 (8,1 kDa).
- L'A-4 qui comprend les mêmes exons que l'A+4 excepté l'exon 4 (6,9kDa) (VEIS *et al.*, 2000).

A+4 stimule en culture le facteur de transcription Sox9, un régulateur du gène de collagène de type II caractéristique des chondrocytes (VEIS *et al.*, 2000).

A-4 stimule en culture le facteur de transcription Cbfa1 (*core binding factor 1*), un facteur de différenciation des chondrocytes et des ostéoblastes (VEIS *et al.*, 2000).

Ces deux formes d'amélogénine, A+4 et A-4 ont donc été implantées *in vivo* sur des pulpes de molaires de rat pour analyser leurs effets sur l'induction de dentine de réparation (GOLDBERG *et al.*, 2006).

Les deux molécules peuvent stimuler la formation de dentine de réparation permettant la fermeture de la plaie pulpaire. Il y a une différence de réponse entre A+4 et A-4 30 jours après l'implantation (SIX *et al.*, 2002) : A+4 induit une minéralisation préférentielle au niveau coronaire tandis que A-4 semble avoir d'avantages d'effet au niveau radiculaire.

La différence biologique entre la zone coronaire et radiculaire décrite dans notre chapitre sur la BMP7 pourrait influencer la réponse pulpaire et expliquer ces résultats (SIX *et al.*, 2003).

Au 90^{ème} jour, il n'existe pas de différence entre les deux molécules ; en particulier, la minéralisation n'a pas progressé par rapport à 30 jours et il reste toujours quelques reliquats de tissu pulpaire dans la racine mésiale (SIX *et al.*, 2003).

Une étude de JEGAT et ses collaborateurs (2007) a permis d'étudier les effets précoces sur la dentinogénèse de réparation de ces deux molécules bioactives.

L'étude a été réalisé *in vivo* sur des pulpes de molaires de rats; les pulpes exposées mécaniquement ont été coiffées comme précédemment décrites de billes d'agarose seules (groupe contrôle) ou imprégnées d'A+4 ou d'A-4 (groupes expérimentaux).

Une étude immunohistochimique a ensuite été réalisée aux jours 1, 3 et 7.

La prolifération cellulaire étudiée par marquage au PCNA est importante à J-3 mais diminuée à J-7 pour l'A+4 ; alors que pour l'A-4, le PCNA est constamment élevé à J-3 et à J-7.

Le marquage au RP59, qui permet d'étudier la différenciation vers la lignée ostéoblastique, montre qu'avec l'A-4 la différenciation est plus ostéoblastique que pour l'A+4. De plus, les cellules positives au RP59 sont moins nombreuses que les cellules marquées au PCNA, ce qui suggère que les cellules qui prolifèrent ne sont pas toutes engagées vers la différenciation ostéoblastique, et que seulement certaines sont sélectionnées selon des critères inconnus.

Les cellules positives à l'ostéopontine (OPN) sont semblables à J-3 et J-7 pour l'A-4. Au contraire, pour l'A+4 le faible marquage à l'OPN à J-3 devient plus important à J-7. Ce marquage à l'OPN montre que les cellules positives au RP59 finalisent leur différenciation vers la lignée ostéoblastique.

La sialoprotéine dentinaire (DSP), un marqueur de la différenciation odontoblastique, n'est pas détectable jusqu'au jour 7 où un faible nombre de cellules devient alors positives à la DSP après la stimulation à l'A-4 mais pas pour l'A+4. Deux possibilités peuvent expliquer ce phénomène : soit seulement quelques « osteoblast-like cells » acquièrent progressivement le phénotype odontoblastique et montrent leur différenciation terminale ; soit un second groupe de cellules est recruté à un faible taux et montrent un phénotype différent (JEGAT *et al.*, 2007)

Des expériences *in vitro* montrent que les progéniteurs pulpaire répondent aux peptides d'amélogénines A+4 et A-4 en activant une cascade de signalisations qui conduit en 48 heures à l'activation d'un programme de différenciation de type ostéo/odontoblastique (LACERDA-PINHEIRO S. *et al.*, 2006). L'expression des messagers codant pour la DSP, une protéine de la matrice dentinaire se fait dès 48 heures avec l'A+4 ou avec l'A-4. Ces résultats *in vitro* diffèrent des résultats *in vivo* précédemment décrits où la DSP n'est détectable qu'au jour 7 et seulement avec l'A-4 (JEGAT *et al.*, 2007).

Dans d'autres études, les deux amélogénines ont été implantées *in vivo* mais dans des sites ectopiques (différents de la pulpe dentaire). Des billes d'agarose imprégnées de A+4 ou de A-4 ont été placées dans la muqueuse des joues de souris, un tissu non minéralisé ou les progéniteurs ostéoblastiques ou odontoblastiques ne sont pas attendus (LACERDA-PINHEIRO *et al.*, 2006).

Les résultats de cette étude montrent que l'implantation des billes d'agarose seules induit le recrutement de cellules inflammatoires CD45+. Quand les billes sont imprégnées des peptides d'amélogénine (A+4 et A-4) l'expression de marqueurs ostéo-chondrogéniques (RP59, Sox9, ou BSP) est observée. Pourtant aucune minéralisation n'est présente, même après 30 jours (LACERDA-PINHEIRO *et al.*, 2006). Ceci suggère que les dernières étapes aboutissant à la minéralisation sont spécifiques et semblent être sous le contrôle du tissu environnant.

Cette expérience montre ainsi que les peptides d'amélogénine ont la capacité de recruter des cellules inflammatoires et des cellules progénitrices mésenchymateuses qui peuvent se différencier dans la lignée ostéo-chondrogénique. La différenciation des précurseurs ostéogéniques n'est donc pas nécessairement dépendante des cellules souches locales.

L'absence de formation de tissu minéralisé met en lumière la différence entre les peptides d'amélogénines et les BMPs ; ces derniers agissant comme des facteurs de croissance en entraînant la formation de tissu minéralisé dans des sites ectopiques (LACERDA-PINHEIRO *et al.* 2006).

L'ensemble de ses résultats montre que les peptides d'amélogénines sont des outils très utiles pour l'investigation des mécanismes impliqués dans la formation de dentine de réparation. Plus d'études sont nécessaires pour déterminer comment l'action de ces molécules est médiée (GOLDBERG *et al.*, 2006).

V.2.2.2.4. Application de l'Enamel Matrix Derivative (EMD).

Aujourd'hui, des protéines de l'émail ectodermique, dérivées de la matrice amélaire de porc foetal (BOSSHARDT *et al.*, 2004), existent sous forme de préparation commerciale (EMDOGAIN® ou EMD, *Enamel Matrix Derivative*). Cette préparation est fréquemment utilisée lors de procédures chirurgicales pour induire la différenciation des cellules mésenchymateuses lors de la cémentogénèse, et la régénération du ligament parodontal sur des patients atteints de parodontites sévères (PONTORIERO *et al.*, 1999).

L'EMD (*Enamel Matrix Derivative*) est fabriqué à partir de dérivés de la matrice amélaire secrétés par la gaine épithéliale de Hertwig de la dent de porc en développement. Ce dérivé de la matrice amélaire contient des amélogénines, son composant principal, ainsi que d'autres protéines de la matrice amélaire comme l'énameline, la tuftéline, l'améline et l'améloblastine.

L'EMD permettrait de mimer l'odontogénèse normale ; il stimule de ce fait la régénération des tissus parodontaux cis : le ciment acellulaire, le ligament alvéolaire, et l'os alvéolaire. Cependant les mécanismes précis du mode de fonctionnement de l'EMD sur la régénération parodontale demeurent encore inconnus (KAIDA *et al.*, 2008).

Les effets de l'EMD comme matériau de coiffage direct sur des pulpes exposées ont été analysés.

NAKAMURA et ses collaborateurs (2001) ont utilisé la thérapie *in vivo* sur des dents permanentes de cochons nains.

Des cavités de classe V sont réalisées. 11 pulpes sont coiffées d'EMDOGAIN® gel (groupe expérimental) et 11 pulpes sont coiffées d'hydroxyde de calcium Dycal® (groupe contrôle). Chaque pulpe est ensuite recouverte de ciment verre ionomère.

Chaque groupe d'étude est divisé en deux sous groupes pour permettre une analyse histologique à 2 semaines et à 4 semaines.

Dans les dents traitées à l'EMD, de larges plages de dentine sont visibles après 4 semaines, associées à une ligne « d'odontoblast-like cells ». L'EMD a le potentiel de promouvoir la formation d'un tissu minéralisé dentinaire lors de son application sur une effraction pulpaire.

Pour le groupe contrôle, l'hydroxyde de calcium à 4 semaines entraîne la formation d'une petite zone de dentine mais aucune ligne odontoblastique n'est visible. L'hydroxyde de calcium n'a pas donné pas de dentine réparatrice spécifique dans cette étude.

Les analyses morphométriques ont montré que la formation de tissu dur dans les dents traitées à l'EMD était deux fois plus importante que dans les dents traitées à l'hydroxyde de calcium ($p < 0,01$), ce qui suggère que l'EMD est capable de promouvoir le processus de réparation de manière plus forte que l'hydroxyde de calcium.

NAKAMURA et ses collaborateurs (2001) expliquent dans cette étude que des analyses *in vitro* (LYNGSTADAAS *et al.*, 2001) ont montré que l'EMD induirait dans les cellules exposées un signal AMP cyclique intracellulaire. Dans les cellules mésenchymateuses, ce signal intracellulaire serait suivi de l'expression de facteurs de croissance parfaitement orchestrée (LYNGSTADAAS *et al.*, 2001). Suite à cette cascade de facteurs de croissance (PDGF, TGF β 1), les cellules exposées à l'EMD proliféreraient et se différencieraient en cellules sécrétant de la matrice extracellulaire.

De plus, l'EMD ajouté à des fibroblastes en culture augmente l'expression d'intégrines connues pour jouer un rôle important dans l'adhésion, le développement et la fonction des cellules mésenchymateuses (HOANG *et al.*, 2002).

Des mécanismes similaires produiraient donc *in vivo*.

NAKAMURA et ses collaborateurs (2004) ont ensuite analysé par étude immunohistochimique sur des pulpes coiffées d'EMD, l'expression du collagène de type I, de la DSP (sialoprotéine dentinaire), de l'améloblastine et enfin de l'EMD.

L'analyse expérimentale *in vivo* a été réalisée sur des pulpes dentaires de cochons nains, et à l'aide de deux groupes expérimentaux, l'un coiffé de Dycal®, l'autre d'EMD. Des pulpotomies ont été effectuées pour créer l'effraction pulpaire.

La quantité de dentine de réparation dans les dents traitées à l'hydroxyde de calcium est significativement plus petite que dans les dents traitées à l'EMD ($p < 0,005$).

L'analyse immunohistochimique montre que l'EMD reste au niveau du site d'exposition pulpaire pendant plus de trois semaines après son application. Pendant cette période, des protéines associées à la dentinogenèse paraissent être séquentiellement exprimées par les cellules du tissu pulpaire endommagé.

L'expression d'améloblastine est ainsi détectée dans les cellules pulpaires 4 jours après l'application d'EMD. Dans les dents traitées à l'hydroxyde de calcium, l'expression d'améloblastine n'apparaît qu'au bout de trois semaines après le coiffage. De plus, dans toutes les dents expérimentales, l'expression d'améloblastine précède la formation de dentine de réparation (NAKAMURA *et al.*, 2004). Une relation étroite entre l'expression d'améloblastine et la dentine de réparation a déjà été observée par SPAHR *et al.* (2002) sur des dents de rats. Ces résultats montrent que l'améloblastine est un signal essentiel à l'induction de la dentine de réparation et que dans la dent adulte, ce signal peut être amélioré par l'application d'EMD (NAKAMURA *et al.*, 2004).

Par ailleurs, le nouveau tissu dur formé par l'application d'EMD répond positivement à la présence de collagène de type I et de DSP. Ces deux protéines sont des marqueurs de la dentine, ce qui confirme que la dentine formée ressemble à de la dentine normale. De la même manière, les pulpes coiffées d'hydroxyde de calcium présentent ces deux marqueurs mais avec un retard dans leur expression de deux semaines environ par rapport aux pulpes coiffées d'EMD (NAKAMURA *et al.*, 2004).

NAKAMURA et ses collaborateurs (2004) concluent par le fait que l'EMD est un inducteur biologique rapide de la formation de dentine de réparation sur les pulpes exposées.

Une étude d'OLSSON et ses collaborateurs (2005) a permis l'analyse de coiffages directs à l'EMD sur des pulpes de dents humaines qui devaient être extraites pour raison orthodontique. Les résultats rapportent que les symptômes postopératoires semblent moins importants lors de coiffages à l'EMD qu'avec le coiffage à l'hydroxyde de calcium. De plus, la quantité de dentine secrétée s'avère plus importante avec l'EMD qu'avec le $\text{Ca}(\text{OH})_2$. D'autres études nécessitent d'être menées avant une application clinique efficace sur des dents humaines.

Une étude de KAIDA et ses collaborateurs (2008) a étudié le processus de guérison pulpaire lors d'un coiffage direct à l'Emdogain gel.

Ils ont ainsi analysé le comportement des cellules inflammatoires pulpaires, l'expression des cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires ainsi que la formation de tissu dur en présence d'EMD par analyse immunohistochimique.

45 rats mâles ont été utilisés et 3 groupes d'étude ont été constitués :

- Groupe 1 expérimental : 30 pulpes avec pulpotomies coiffées d'Emdogain gel.
- Groupe 2 contrôles : 30 pulpes avec pulpotomies coiffées de Vitapex (hydroxyde de calcium)
- Groupe 3 témoins relatifs : 30 pulpes avec pulpotomies sans coiffage.

Immédiatement après leur préparation, les cavités ont été obturées de ciment verre ionomère. Chaque groupe est divisé en trois sous groupes de 10 rats ; les rats inclus dans chacun de ces sous groupes sont sacrifiés respectivement au bout de 7 jours, 14 jours et 28 jours.

Des préparations histologiques conventionnelles suivies d'une analyse de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et d'une analyse immunohistochimique ont été réalisées. L'analyse immunohistochimique permet de mettre en évidence les éléments cis : la présence de macrophages, de cellules T, de TGF β 1, d'interleukine-1 β (IL-1 β), de BMP-2, de BMP-4 et enfin de DMP-1.

Les auteurs remarquent alors que dans tous les groupes expérimentaux une forte activité de la phosphatase alcaline ainsi qu'une dentine de réparation positive à la DMP-1 apparaît. La phosphatase alcaline est un marqueur des tissus durs et la DMP-1 joue un rôle important dans la minéralisation de la matrice et la différenciation odontoblastique. Les auteurs concluent par le fait qu'une formation de dentine minéralisée réparatrice a été induite dans tous les groupes

étudiés (KAIDA *et al.*, 2008). Pourtant, la quantité de dentine de réparation dans le groupe traité à l'EMD est significativement plus grande que dans les deux autres groupes.

Dans le groupe traité à l'hydroxyde de calcium, le nombre de macrophages exprimant l'IL- β 1 augmente initialement suivi par l'expression de macrophages exprimant le TGF- β 1. Les cellules exprimant les BMPs augmentent progressivement en nombre avec l'augmentation de la formation de dentine de réparation. Les résultats trouvés avec le groupe témoin relatif montrent des résultats similaires, bien que la quantité de dentine réparatrice observée soit moins importante.

Pour le groupe traité à l'EMD, les cellules exprimant l'IL- β 1 ou le TGF- β 1 sont faibles. Cependant, le nombre de cellules exprimant les BMPs augmente dans la phase précoce, et de larges plages de dentine réparatrice apparaissent.

Les auteurs expliquent que lors du remodelage du tissu osseux, la réaction inflammatoire est d'abord le lieu d'un infiltrat inflammatoire, et de cytokines inflammatoires comme l'IL- β 1. Puis, les cellules exprimant des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β 1 augmentent et un tissu de granulation se forme. Ensuite, le nombre de cellules exprimant les BMPs augmente et la formation de tissu osseux est alors activé. Les résultats de cette expérience montre donc que le processus de guérison pulpaire dans le groupe traité à l'hydroxyde de calcium est similaire au remodelage osseux (KAIDA *et al.*, 2008).

Par contre, les résultats obtenus avec le groupe traité à l'EMD semblent différer des circonstances normales.

Les effets des BMPs ont été montrés sur la stimulation de la dentinogénèse de réparation sur des modèles animaux (partie V.2.1.1.3). Or, dans le groupe traité à l'EMD, le nombre de cellules macrophagiques exprimant les BMPs augmente dans la phase précoce et ceci semble associé à l'apparition de larges plages de dentine de réparation. Il s'avère que l'EMD contiendrait des molécules ressemblant aux BMPs (*BMP-like molecules*) (TAKAYAMA *et al.*, 2005). L'induction de l'expression de BMPs ainsi que la présence de *BMP-like molecules* dans la composition de l'EMD doit peut être promouvoir la différenciation odontoblastique ainsi que la dentinogénèse de réparation (KAIDA *et al.*, 2008). Il serait nécessaire

d'examiner *in vivo* et *in vitro* quelles substances précises contenues dans l'EMD induirait l'expression de BMPs par les macrophages (KAIDA *et al.*, 2008).

Cette étude montre donc des différences entre les processus de guérison pulpaire induits par l'hydroxyde de calcium et l'Emdogain appliqués en coiffages direct. Les macrophages exprimant les BMPs en présence d'EMD paraissent jouer un rôle important lors de la dentinogénèse de réparation (KAIDA *et al.*, 2008).

L'Emdogain gel à la lumière de ces études semble promouvoir la dentinogénèse de réparation lors de coiffages directs sur une pulpe endommagée. Il paraît agir de manière précoce en entraînant la formation de larges plages de dentine minéralisée. D'autres études nécessitent d'être conduites avant son utilisation en clinique sur des dents humaines.

V.2.2. THERAPIE GENIQUE IN VIVO.

Le potentiel de cicatrisation de la pulpe peut être induit par la transfection à l'aide d'un plasmide du gène de la molécule bioactive directement sur la pulpe exposée *in vivo* (NAKASHIMA *et al.*, 2006).

Les plasmides d'ADN complémentaires utilisés présentent en effet plusieurs avantages à prendre en considération comme un haut niveau de pureté, une manipulation facile, un risque minimal de répllication ou d'incorporation, et ils sont faiblement immunogènes (NAKASHIMA et AKAMINE, 2005).

NAKASHIMA et ses collaborateurs (2003) ont par exemple montré que la thérapie génique *in vivo* par transfert de Gdf-11 (ou BMP-11 ; *Bone Morphogenetic Protein-11*) par sonoporation à l'aide d'ultrasons stimulait la formation de dentine de réparation sur des pulpes exposées de dents de chiens. Il faut noter que cette technique serait irréalisable cliniquement malgré des résultats prometteurs sur la réparation dentinaire.

V.2.3. SYNTHÈSE.

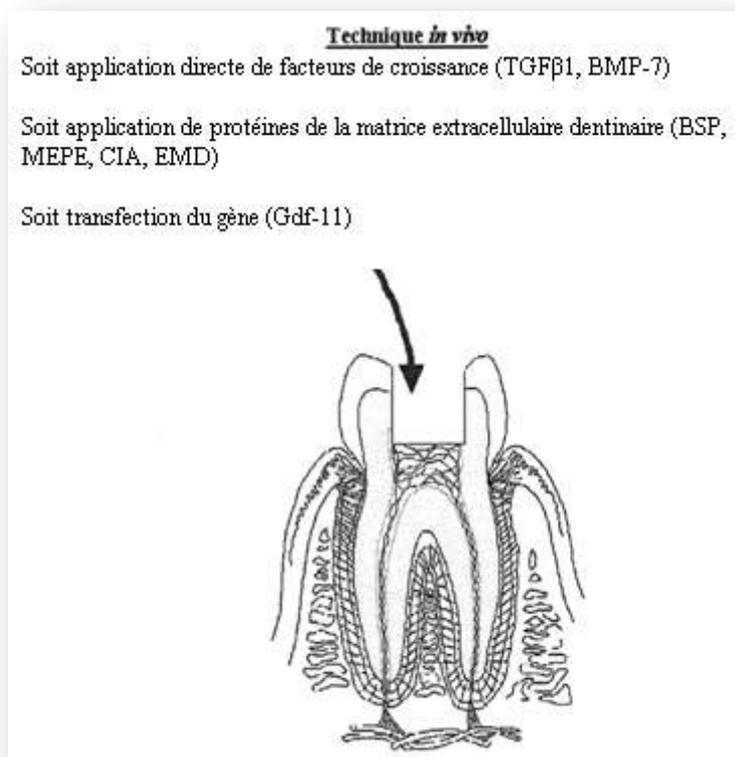


Figure 13 : Application expérimentale *in vivo* du potentiel de régénération des cellules souches de la pulpe dentaire. D'après RENARD *et al.*, 2007.

Ces molécules bioactives stimulent la formation de dentine de réparation. Elles provoquent toutes le recrutement de cellules indifférenciées qui entrent alors dans une cascade de différenciation. Ces cellules produisent ainsi une matrice extracellulaire qui minéralise ultérieurement.

Cependant, toutes ces applications demeurent encore expérimentales.

D'autres études devront être menées avant l'utilisation de ces molécules en pratique quotidienne pour déterminer :

- L'effet dose-dépendant de ces molécules.
- Si la minéralisation provoquée reste limitée dans le temps et l'espace ou non.
- Si ces stratégies peuvent s'appliquer aux dents non vitales ou traitées de façon insuffisante et permettre ainsi un élargissement des indications du coiffage direct (GOLDBERG *et al.*, 2002).

V.3. TECHNIQUES EX VIVO.

Dans cette technique, les cellules souches de la pulpe dentaire sont d'abord isolées, puis ensuite induites en différenciation odontoblastique (RENARD *et al.*, 2007).

V.3.1. INDUCTION ODONTOBLASTIQUE PAR APPLICATION DIRECTE DE BMP-2 (BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2).

Le principe est de cultiver des cellules souches en présence de BMP-2 en quantité supérieure à ce qui existe normalement à l'état physiologique. Ces cellules souches sont dans un second temps appliquées sur la pulpe exposée.

L'expression de BMP-2 est augmentée pendant la phase terminale de différenciation odontoblastique (NAKASHIMA *et al.*, 1994).

IOHARA et son équipe (2004) ont utilisé la thérapie cellulaire *ex vivo* pour induire la dentinogénèse de réparation avec la BMP-2.

Ils ont utilisé des cellules pulpaire de porcs. Ces cellules ont été mises en culture dans un milieu spécifique et elles ont formé des amas multicouches formant des agrégats. Le milieu de culture a été complété de BMP-2. Dans le même temps, des cultures monocouches de cellules pulpaire stimulées à l'aide de BMP-2 ont été utilisées comme contrôles.

La prolifération cellulaire, la quantification du collagène produit, et la sécrétion de molécules spécifiques (la β -actine, l' $\alpha 1$ (1) collagène, la DMP-1, la DSPP, l'Osterix, la MMP20, la *Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome* ou Phex, le Cbfa1 et le Cbfa3) marquant la différenciation odontoblastique ont été étudiés par RT-PCR.

La MMP-20 est une métalloprotéase détectée pendant la sécrétion de pré dentine par les odontoblastes. La Phex est une enzyme de la surface cellulaire impliquée dans l'homéostasie du phosphate pendant la différenciation odontoblastique.

Il apparaît que l'action de la BMP-2 est amplifiée dans les cultures multicouches versus les cultures monocouches, puisque la DMP1, la DSPP, la MMP20 et la Phex sont augmentés significativement. Ceci peut être du à l'interaction inter-cellulaire qui est favorisée dans les cultures en amas.

Dans la dernière partie de leur expérimentation, les auteurs ont réalisé des cultures multicouches traitées au BMP-2, à partir de cellules pulpaire d'incisives supérieures de chiens. Puis dans un second temps, ils ont, après exposition mécanique pulpaire des canines des chiens, appliqué les cultures multicouches en coiffage direct *in vivo* au 14^{ème} jour de culture. Ils ont observé de larges plages d'ostéodentine au bout de un mois comparés aux implantations des cultures multicouches non traitées au BMP-2.

L'auteur conclue par le fait que la culture préalable des cellules et le contrôle de leur prolifération et de leur différenciation avant implantation sur la pulpe exposée optimise les capacités des BMP-2.

De même, Iohara *et al.* (2007) ont étudié une nouvelle fois la thérapie cellulaire *ex vivo* sur des dents de chiens. Cette fois, ils ont procédé à des cultures cellulaires en amas de cellules SP (*Side Population*) issues des canines des chiens, stimulées ou non à l'aide de BMP2 recombinante pendant 14 jours.

Les amas de cellules ont ensuite été implantés sur les pulpes des dents de chiens (transplantation autologue) exposées mécaniquement, puis recouvertes de composite. Les dents ont ensuite été extraites un mois après le coiffage. La formation de dentine de réparation a été évaluée par analyse histologique.

Les cellules pulpaire SP se différencient en ostéodentinoblastes et secrètent de la matrice ostéodentinaire autour d'elles un mois après le coiffage. Une large plage d'ostéodentine est observée dans le groupe expérimental traité au BMP2 par rapport au groupe contrôle où il y a une petite plage d'ostéodentine (Figure 14).

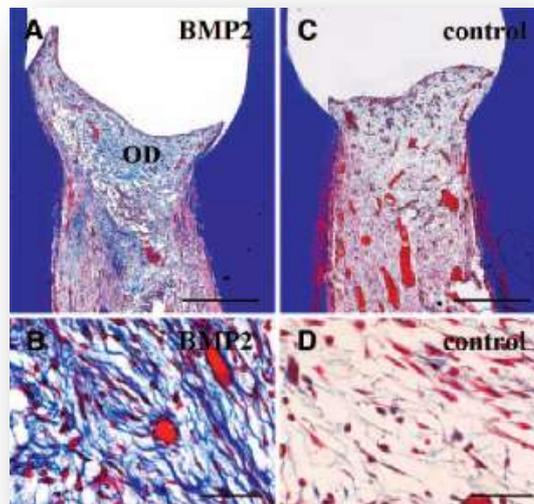


Figure 14 : Transplantation autologue *in vivo* de cultures en amas de cellules SP sur des pulpes exposées de canines de chiens (coupes colorées au Trichrome de Masson). (A, B) : Formation d'ostéodentine (OD), un mois après la transplantation de cellules SP traitées au BMP2. (C, D) : Petite plage d'ostéodentine pour le groupe contrôle. D'après IOHARA *et al.*, 2007.

V.3.2. INDUCTION ODONTOBLASTIQUE PAR TRANSFECTION DU GENE DU MORPHOGENE.

La thérapie génique est un outil thérapeutique permettant de délivrer des gènes spécifiques dans des cellules cibles.

L'adénovirus ou le plasmide sont utilisés en thérapie génique comme vecteurs du gène voulu.

Le principe est donc de cultiver des cellules souches et de les transfecter avec le gène d'une molécule bioactive à l'aide d'un adénovirus ou d'un plasmide. Ces cellules souches sont dans un second temps appliquées sur la pulpe exposée à l'aide d'un support (RENARD *et al.*, 2007).

V.3.2.1. INDUCTION ODONTOBLASTIQUE PAR TRANSFECTION DU GENE DE LA BMP-7 (BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-7).

Une étude de 2007 de LIN et ses collaborateurs (2007) part du constat que la BMP-7 induit la dentinogénèse de réparation sur des pulpes exposées de nombreux modèles animaux, mais que peu d'éléments sont connus sur la manière dont la BMP-7 induit la différenciation des DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*) en « odontoblast- like cells ». D'autre part, il est noté que la BMP-7 a une demi-vie courte et une faible spécificité ce qui réduit les possibilités de son application directe en clinique.

LIN *et al.* (2007) ont en premier lieu isolé des cellules pulpaire humaines de dents nécessitant d'être extraites pour raisons orthodontiques sur des personnes âgées de 19 ans.

Ces cellules ont été infectées à l'aide d'un adénovirus-BMP7 (Ad-BMP-7) lors de leur culture primaire. Deux autres groupes ont été formés ; un groupe de cellules infectées avec un adénovirus Ad-EGFP (*adenovirus-mediated enhanced green fluorescent protein*) et un groupe de cellules qui n'ont pas été infectées.

L'adénovirus Ad-BMP-7 induit alors l'expression de BMP-7 dans les cellules pulpaire humaines au long terme avec peu d'effets sur la prolifération et la viabilité cellulaire. Ceci

suggère que l'infection à l'Ad-BMP-7 est faiblement cytotoxique. D'autre part, l'expression de la BMP-7 au long terme généré par l'adénovirus pourrait ainsi compenser sa courte demi-vie.

Cette étude montre que les cellules infectées à l'Ad-BMP-7 présentent une augmentation significative de l'activité de la phosphatase alcaline comparées aux groupes contrôles, l'induction de l'expression de la DSPP de manière dose dépendante et temps dépendant et la formation de nodules minéralisés ce qui suggère la différenciation odontoblastique.

Ces observations révèlent que la thérapie génique grâce à la BMP-7 pourrait être efficace pour promouvoir la minéralisation lors de coiffages directs de la pulpe. Plus de recherches nécessitent d'être menées avant l'utilisation de ce système en application clinique notamment en terme de sécurité et d'efficacité (LIN *et al.*, 2007).

V.3.2.2. INDUCTION ODONTOBLASTIQUE PAR TRANSFECTION DU GENE DE LA BMP-11.

La BMP-11 ou Gdf-11 (Growth/Differentiation factor 11) est exprimé par les odontoblastes (NAKASHIMA *et al.*, 1999).

Une étude de NAKASHIMA et ses collaborateurs (2004) étudie la formation de dentine de réparation par la technique de thérapie génique *ex vivo* grâce à la Gdf-11.

Des cellules pulpaire de porc sont dans un premier temps isolées et cultivées. Un plasmide transportant le Gdf-11 de souris associé à un vecteur pEGFP (*enhanced green fluorescent protein*) ainsi qu'un inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase (*TIMP*) est alors ajouté aux cellules pulpaire en suspension : ces cellules constituent le groupe étudié : pEGFP-TIMP-GDF11.

Un autre groupe de cellules est constitué, le groupe contrôle, auquel on rajoute le plasmide pEGFP-TIMP sans le gène de Gdf-11.

Une électroporation est ensuite réalisée. Le choix de l'électroporation pour le transfert génique s'est basé sur le souhait de vouloir minimiser la potentielle immunité cellulaire que produisent les vecteurs viraux comme les adénovirus. De plus, l'électrotransfection des plasmides dans les cellules aboutit au transfert et à l'expression de l'ADN voulu de manière

rapide et efficace. Les ondes électriques permettent l'ouverture transitoire des pores membranaires des cellules ; cela conduit à l'entrée de l'ADN chargé négativement dans le cytoplasme puis dans le noyau des cellules en culture.

Suite à cette électrotransfection, les cellules sont cultivées en trois dimensions pour favoriser la différenciation odontoblastique. IOHARA et son équipe (2004) avaient en effet montré l'importance des cultures cellulaires en amas, c'est ce qui a été décrit dans le chapitre sur la BMP-2.

Une analyse par RT-PCR des transcrits des marqueurs spécifiques de la différenciation odontoblastique (*enamelysin*, *Phex*, *phosphatase alcaline*, *DMP-1*, *DSPP*, *$\alpha 1$ (1) collagène*) est ensuite réalisée sur les deux groupes de cellules. Il apparaît alors que l'expression de tous ces marqueurs est augmentée dans le groupe de cellules transfectées de Gdf-11 comparé au groupe contrôle non transfecté du facteur de croissance.

Ceci nous indique que le transfert du gène de Gdf-11 a permis la différenciation des progéniteurs pulpaire en odontoblastes en culture.

Cette technique a été appliquée aux cellules de chiens (NAKASHIMA *et al.*, 2004)

Ces cultures en trois dimensions sont ensuite posées sur la pulpe dentaire des animaux (transplantation autologue) *in vivo* après préparation cavitaire et effraction pulpaire puis les dents sont obturées avec du ciment verre ionomère et du composite.

Les auteurs observent alors au bout d'un mois la formation d'ostéodentine. L'analyse statistique montre que la quantité d'ostéodentine est moitié moins importante dans le groupe contrôle p-EGFP versus le groupe p-EGFP-Gdf-11. Au bout de trois mois, une forte quantité de dentine tubulaire est observée dans le groupe Gdf-11 comparé au groupe contrôle.

Cette technique de thérapie génique *ex vivo* induit la formation de dentine de réparation en particulier de dentine tubulaire. Cela paraît être une technique prometteuse d'après les auteurs.

Pourtant même si expérimentalement l'induction de dentine réparatrice est efficace, cette technique serait difficilement voire impossible à réaliser dans l'exercice quotidien au cabinet dentaire.

V.3.3. SYNTHÈSE.

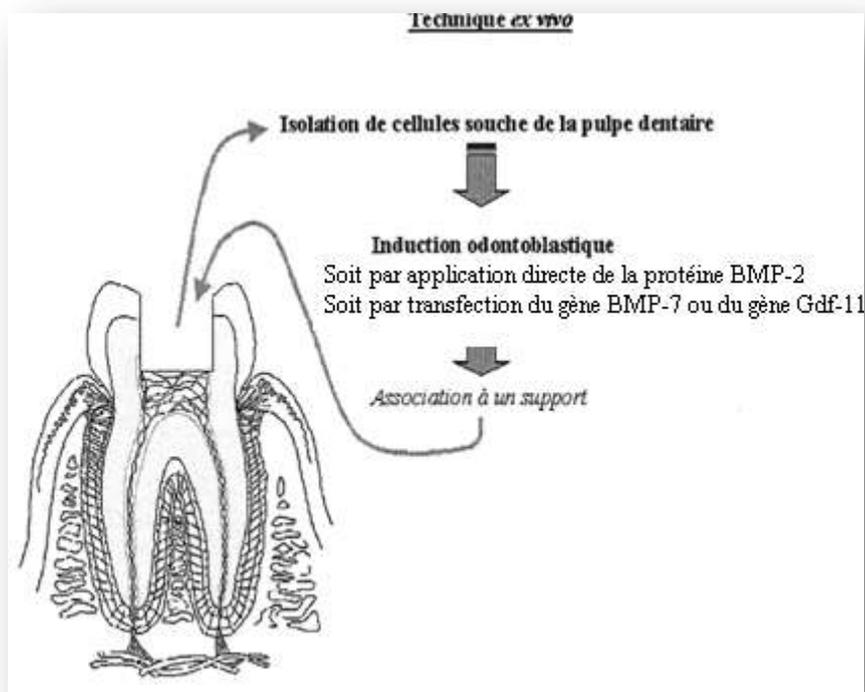


Figure 15 : Application expérimentale *ex vivo* du potentiel de régénération des cellules souches de la pulpe dentaire. D'après RENARD *et al.*, 2007.

La thérapie *ex vivo* constitue une découverte primordiale de la recherche sur la reconstitution du complexe pulpodentinaire lors d'exposition pulpaire bien que ces techniques demeurent encore trop complexes pour leur utilisation en clinique.

Par ailleurs, il faudrait étudier si l'absence de cellules souches ou de vascularisation au sein d'une dent pourrait être compensée par l'ingénierie tissulaire (GOLDBERG *et al.*, 2002).

VI. CONCLUSION.

Actuellement, lors d'une effraction pulpaire chez un patient jeune et dont la pulpe a conservé son potentiel de cicatrisation, l'application d'hydroxyde de calcium provoque la formation d'un pont dentinaire : la dentine de réparation.

Cependant, les mécanismes d'action de cet agent de coiffage pulpaire direct sont empiriques et les indications du Ca(OH)_2 sont limitées. Récemment, l'identification de cellules souches au sein de la pulpe dentaire a ouvert de nouvelles perspectives. L'utilisation de molécules bioactives permettant de stimuler spécifiquement les progéniteurs des odontoblastes de seconde génération et donc d'induire la dentinogenèse de réparation constitue une innovation majeure. La régénération dentinaire après coiffage pulpaire est ainsi de mieux en mieux comprise.

L'objectif ultime serait de reconstruire, grâce aux techniques d'ingénierie tissulaire, le complexe pulpodentinaire sur une dent non vitale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1. ABOUT I, CAMPS J, MITSIADIS TA et coll.**
Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts.

J Biomed Mater Res 2002;**63**(4):418-423.
- 2. ABOUT I, LAURENT-MAQUIN D, LENDAHL U et coll.**
Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions.

Am J Pathol 2000 Jul;**157**(1):287-295.
- 3. AEINEHCHI M, ESLAMI B, GHANBARIHA M et coll.**
Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report.

Int Endod J 2003 Mar;**36**(3): 225-231.
- 4. ALLARD B, MAGLOIRE H, COUBLE ML et coll.**
Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission.

J Biol Chem 2006 Sep 29;**281**(39):29002-29010.
- 5. ALLIOT-LICHT B, HURTREL D et GREGOIRE M.**
Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures.

Arch Oral Biol 2001 Mar;**46**(3):221-228.
- 6. ALLIOT LICHT B, BLUTEAU G, LOPEZ-CAZAUX et coll.**
Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures.

Cell Tissue Res 2005 Sep;**321**(3):391-400.

- 7. ALLIOT-LICHT B, BLUTEAU G, LOPEZ- CAZAUX S et coll.**
Cellules progénitrices pulpaire et réparation dentinaire.

Cah ADF 2006;20:43-49.
- 8. AMAR S, SIREB B, SABSAY B et coll.**
The isolation and partial characterization of a rat incisor dentin matrix polypeptide with in vitro chondrogenic activity.

J Biol Chem 1991;266(13):8609-8618.
- 9. ANDELIN WE, SHABAHANG S, WRIGHT K et coll.**
Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker.

J Endod 2003 Oct;29(10):646-650.
- 10. AURIOL M.M, LE CHARPENTIER Y et LE NAOUR G.**
Histologie du complexe pulpodentinaire.

Encycl Méd Chir (Paris),Stomatologie/Odontologie,22-007-B-10,2000,15.
- 11. BOSSHARDT DD et NANJI A.**
Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth.

J Clin Periodontol 2004;31(3):184-192.
- 12. CAMILLERI J et PITT FORD TR.**
Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material

Int Endod J 2006 Oct;39(10):747-754.
- 13. CASAGRANDE L, MATTUELLA LG, DE ARAUJO FB et coll.**
Stem cells in dental practice: perspectives in conservative pulp therapies.

J Clin Pediatr Dent 2006;31(1):25-27.

14. CASSIDY N, FAHEY M, PRIME SS et coll.

Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices.

Arch Oral Biol 1997 Mar;**42**(3):219-223.

15. CHAUNG HM, HONG CH, CHIANG CP et coll.

Comparison of calcium phosphate cement mixture and pure calcium hydroxide as direct pulp-capping agents.

J Formos Med Assoc 1996 Jul;**95**(7):545-550.

16. COSTA CA, EDWARDS CA et HANKS CT.

Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures.

Am J Dent 2001 Feb;**14** (1):25-30.

17. COUBLE ML, FARGES JC, BLEICHER F et coll.

Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures.

Calcif Tissue Int 2000 Feb;**66**(2):129-138.

18. COX CF, SÜBAY RK, OSTRO E et coll.

Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping.

Oper Dent 1996;**21**(1):4-11.

19. DESMOULIERE A, CHAPONNIER C et GABBIANI G.

Tissue repair, contraction, and the myofibroblast.

Wound Repair Regen 2005 Jan-Feb;**13**(1):7-12.

20. DOBIE K, SMITH G, SLOAN AJ et SMITH AJ.

Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro.

Connect Tissue Res 2002;**43**(2/3):387-390.

21. DURAND SH, FLACHER V, ROMEAS A et coll.

Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts.

J Immunol 2006 Mar 1;**176**(5):2880-2887.

22. EDWARDS PC et MASON JM.

Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: (1) overview and practical considerations.

Head Face Med 2006a May;**15**:2-12.

23. EDWARDS PC et MASON JM.

Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: (2) dentin-pulp and periodontal regeneration.

Head Face Med 2006b May 25;**2**:16.

24. ESTRELA C, SYDNEY GB, BAMMANN LL et coll.

Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria.

Braz Dent J 1995;**6**(2):85-90.

25. EUROPEAN SOCIETY OF ENDODONTOLOGY.

Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology.

Int Endod J 2006;**39**(12):921-930.

26. FARSI N, ALAMOUDI N, BALTO K et coll.

Success of mineral trioxide aggregate in pulpotomized primary molars.

J Clin Pediatr Dent 2005;**29**(4):307-311.

27. FARSI N, ALAMOUDI N, BALTO K et coll.

Clinical assessment of mineral trioxide aggregate (MTA) as direct pulp capping in young permanent teeth.

J Clin Pediatr Dent 2006;**31**(2):72-76.

28. GOLDBERG M, LACERDA-PINHEIRO S, JEGAT N et coll.

The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry.

Dent Clin North Am 2006;**50**(2):277-298.

29. GOLDBERG M, SIX N, DECUP F et coll.

Minéralisation de la pulpe dentaire: comment induire à la demande de la dentine réparatrice ou faire minéraliser l'ensemble de la pulpe radiculaire : ingénierie tissulaire et thérapeutiques pulpaires de demain en odontologie.

Cah ADF 2001;11:25-32.

30. GOLDBERG M, SIX N, DECUP F et coll.

Minéralisation de la pulpe dentaire : apport de l'ingénierie tissulaire aux thérapeutiques de demain en odontologie.

Pathol Biol 2002;**50**:94-203.

31. GOLDBERG M et PIETTE E.

La dent normale et pathologique.

Bruxelles : De Boeck Université, 2001.

32. GOLDBERG M et SMITH AJ.

Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering.

Crit Rev Oral Biol Med 2004 Jan;**15**(1):13-27.

33. GOLDBERG M, SIX N, DECUP F et coll.

Bioactive molecules and the future of pulp therapy.

Am J Dent 2003 Feb;**16**(1):66-76.

34. GRONTHOS S, BRAHIM J, LI W et coll.

Stem cell properties of human dental pulp stem cells.

J Dent Res 2002 Aug;**81**(8):531-535.

35. GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J et coll.

Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.

Proc Natl Acad Sci USA 2000 Dec 5;**97**(25):13625-13630.

36. HAFEZ AA, COX CF, TARIM B et coll.

An in vivo evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one- or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps.

Quintessence Int 2002 Apr;**33**(4):261-272.

37. HAFEZ AA, KOPEL HM et COX CF.

Pulpotomy reconsidered: application of an adhesive system to pulpotomized permanent primate pulps.

Quintessence Int 2000 Sep;**31**(8):579-589.

38. HELING I, ROTSTEIN I, DINUR T et coll.

Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro.

J Endod 2001 Apr;**27**(4):278-280.

39. HEYMANN R, ABOUT I, LENDAHL U et coll.

E- and N-cadherin distribution in developing and functional human teeth under normal and pathological conditions.

Am J Pathol 2002 Jun;**160**(6):2123-2133.

- 40. HOANG AM, KLEBE RJ, STEFFENSEN B et coll.**
Amelogenin is a cell adhesion protein.
J Dent Res 2002;**81**(7):497-500.
- 41. HU B, UNDA F, BOPP-KUCHLER S et coll.**
Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells.
J Dent Res 2006 May;**85**(5):416-421.
- 42. IOHARA K, NAKASHIMA M, ITO M et coll.**
Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2.
J Dent Res 2004 Aug;**83**(8):590-595.
- 43. IOHARA K, ZHENG L, ITO M et coll.**
Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis.
Stem Cells 2006 Nov;**24**(11):2493-2503.
- 44. ISO-7405**
Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry, test methods for dental materials.
International Organization for Standardization – ISO E,1997: 1-18.
- 45. IVANOVSKI S, GRONTHOS S, SHI S et coll.**
Stem cells in the periodontal ligament.
Oral Dis 2006;**12**(4):358-363.
- 46. JEAN A, KEREBEL B, KEREBEL LM et coll.**
Effects of various calcium phosphate biomaterials on reparative dentin bridge formation.
J Endod 1988;**14**(2):83-87.

47. JEGAT N, SEPTIER D, VEIS A et coll.

Short-term effects of amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in the exposed rat molar pulp.

Head Face Med 2007 Dec 21;**3**:40.

48. KAIDA H, HAMACHI T, ANAN H et coll.

Wound healing process of injured pulp tissues with emdogain gel.

J Endod 2008;**34**(1):26-30.

49. KITAMURA C, KIMURA K, NAKAYAMA T et coll.

Temporal and spatial expression of c-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars.

J Dent Res 1999;**78**(2):673-680.

50. KITASAKO Y, INOKOSHI S et TAGAMI J.

Effects of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps.

J Dent 1999;**27**(4):257-263.

51. KOLINIOTOU-KOUMPIA E et TZIAFAS D.

Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems.

J Dent 2005;**33**(8):639-647.

52. LACERDA-PINHEIRO S, JEGAT N, SEPTIER D et coll.

Early in vivo and in vitro effects of amelogenin gene splice products on pulp cells.

Eur J Oral Sci 2006;**114**(Suppl 1):232-238.

53. LACERDA-PINHEIRO S, SEPTIER D, TOMPKINS K et coll.

Amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in soft tissue determine the reorientation of CD45-positive cells to an osteo-chondrogenic lineage.

J Biomed Mater Res A 2006 Dec 15;**79**(4):1015-1022.

54. LIN ZM, QIN W, ZHANG NH et coll.

Adenovirus-mediated recombinant human bone morphogenetic protein-7 expression promotes differentiation of human dental pulp cells.

J Endod 2007;**33**(8):930-935.

55. LIU H, LI W, GAO C et coll.

Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation.

J Dent Res 2004 Jun;**83**(6):496-499.

56. LIU H, LI W, SHI S et coll.

MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate.

Arch Oral Biol 2005 Nov;**50**(11):923-928.

57. LU Y, LIU T, LI X et coll.

Histologic evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide in beagles.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006 Oct;**102**(4):e78-e84.

58. LYGSTADAAS SP, LUNDBERG E, EKDAHL H et coll.

Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative.

J Clin Periodontol 2001;**28**(2):181-188.

59. MACDOUGALL M, SIMMONS D, LUAN X et coll.

Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination.

J Biol Chem 1997 Jan 10;**272**(2):835-842.

- 60. MACDOUGALL M, SIMMONS D, GU TT et coll.**
MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21.
Connect Tissue Res 2002;**43**(2/3):320-330.
- 61. MAGLOIRE H, COUBLE ML, ROMEAS A et coll.**
Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses.
Cell Biol Int 2004;**28**(2):93-99.
- 62. MAURIN JC, COUBLE ML, DIDIER-BAZES M et coll.**
Expression and localization of reelin in human odontoblasts.
Matrix Biol 2004 Aug;**23**(5):277-285.
- 63. MAURIN JC, DELORME G, MACHUCA-GAYET I et coll.**
Odontoblast expression of semaphorin 7A during innervation of human dentin.
Matrix Biol 2005 May;**24**(3):232-238.
- 64. MITSIADIS TA, RAHIOTIS C.**
Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury.
J Dent Res 2004 Dec;**83**(12):896-902.
- 65. MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M et coll.**
SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth.
Proc Natl Acad Sci USA 2003 May 13;**100**(10):5807-5812.
- 66. MURRAY PE et GARCIA-GODOY F.**
The incidence of pulp healing defects with direct capping materials.
Am J Dent 2006 Jun;**19**(3):171-177.

- 67. NAIR PN, DUNCAN HF, PITT FORD TR et coll.**
Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial.
Int Endod J 2008 Feb;**41**(2):128-150.
- 68. NAKAMURA Y, HAMMARSTRÖM L, LUNDBERG E et coll.**
Enamel matrix derivative promotes reparative processes in the dental pulp.
Adv Dent Res 2001;**15**:105-107.
- 69. NAKAMURA Y, SLABY I, MATSUMOTO K et coll.**
Immunohistochemical characterization of rapid dentin formation induced by enamel matrix derivative.
Calcif Tissue Int 2004;**75**(3):243-252.
- 70. NAKASHIMA M.**
Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix.
Arch Oral Biol 1994 Dec;**39**(12):1085-1089.
- 71. NAKASHIMA M et AKAMINE A.**
The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics.
J Endod 2005 Oct;**31**(10):711-718.
- 72. NAKASHIMA M, IOHARA K, ISHIKAWA M et coll.**
Stimulation of reparative dentin formation by ex vivo gene therapy using dental pulp stem cells electrotransfected with growth/differentiation factor 11 (Gdf11).
Hum Gene Ther 2004 Nov;**15**(11):1045-1053.

73. NAKASHIMA M, IOHARA K et ZHENG L.

Gene therapy for dentin regeneration with bone morphogenetic proteins.

Curr Gene Ther 2006 Oct;**6**(5):551-560.

74. NAKASHIMA M, NAGASAWA H, YAMADA Y et coll.

Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells.

Dev Biol 1994 Mar;**162**(1):18-28.

75. NAKASHIMA M, TACHIBANA K, IOHARA K et coll.

Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11.

Hum Gene Ther 2003 Apr 10;**14**(6):591-597.

76. NAKASHIMA M, TOYONO T, AKAMINE A et coll.

Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis.

Mech Dev 1999 Feb;**80**(2):185-189.

77. NEBGEN DR, INOUE H, SABSAY B et coll.

Identification of the chondrogenic-inducing activity from bovine dentin (bCIA) as a low-molecular-mass amelogenin polypeptide.

J Dent Res 1999 Sep;**78**(9):1484-1494.

78. OLIVI G, GENOVESE MD, MATURO P et coll.

Pulp capping: advantages of using laser technology.

Eur J Paediatr Dent 2007 Jun;**8**(2):89-95.

79. OLSSON H, DAVIES JR, HOLST KE et coll.

Dental pulp capping: effect of Emdogain Gel on experimentally exposed human pulps.

Int Endod J 2005;**38**(3):186-194.

80. PONTORIERO R, WENNSTRÖM J et LINDHE J.

The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled clinical study.

J Clin Periodontol 1999;**26**(12):833-840.

81. QIN C, BRUNN JC, CADENA E et coll.

The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone.

J Dent Res 2002;**81**:392-394.

82. RENARD E, LOPEZ-CAZAUX S, GUICHEUX J et coll.

Stem cells of dental pulp.

CR Biol 2007 Sep;**330**(9):635-643.

83. RUTHERFORD RB.

BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps.

Eur J Oral Sci 2001 Dec ;**109**(6):422-424.

84. RUTHERFORD RB, WAHLE J, TUCKER M et coll.

Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1.

Arch Oral Biol 1993 Jul;**38**(7):571-576.

85. SAMPATH TK, MALIAKAL JC, HAUSCHKA PV et coll.

Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro.

J Biol Chem 1992 Oct 5;**267**(28):20352-20362.

- 86. SEUX D, COUBLE ML, HARTMANN DJ et coll.**
Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement.
Arch Oral Biol 1991;**36**(2):117-128.
- 87. SHI S, BARTOLD PM, MIURA M et coll.**
The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures.
Orthod Craniofac Res 2005 Aug;**8**(3): 191-199.
- 88. SHI S et GRONTHOS S.**
Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp.
J Bone Miner Res 2003 Apr;**18**(4):696-704.
- 89. SILVA AF, TARQUINIO SB, DEMARCO FF et coll.**
The influence of haemostatic agents on healing of healthy human dental pulp tissue capped with calcium hydroxide.
Int Endod J 2006 Apr;**39**(4):309-316.
- 90. SIX N, LASFARGUES JJ et GOLDBERG M.**
Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1).
Arch Oral Biol 2002 Mar;**47**(3):177-187.
- 91. SIX N, LEGRAND JM, SEPTIER D et coll.**
Effet de molécules ostéogéniques sur la minéralisation pulpaire- potentiel thérapeutique.
Cah ADF 2003;14 :18-27.
- 92. SIX N, SEPTIER D, CHAUSSAIN-MILLER C et coll.**
Dentonin, a MEPE fragment, initiates pulp-healing response to injury.
J Dent Res 2007 Aug;**86**(8):780-785.

93. SLOAN AJ et SMITH AJ.

Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair.

Oral Dis 2007 Mar;**13**(2):151-157.

94. SMITH AJ.

Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators.

J Dent Educ 2003 Jun;**67**(6):678-689.

95. SMITH AJ et LESOT H.

Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair?

Crit Rev Oral Biol Med 2001;**12**(5):425-437.

96. SPAHR A, LYGSTADAAS SP, SLABY I et coll.

Expression of amelin and trauma-induced dentin formation.

Clin Oral Invest 2002;**6**(1):51-57.

97. TAKAYAMA T, SUZUKI N, NARUKAWA M et coll.

Enamel matrix derivative stimulates core binding factor alpha1/Runt-related transcription factor-2 expression via activation of Smad1 in C2C12 cells.

J Periodontol 2005;**76**(2):244-249.

98. TORABINEJAD M et COCHET JY.

Le MTA : Un matériau nouveau pour de nombreuses applications cliniques.

Inf Dent 2002;**84**(15):1503-1502.

99. TORABINEJAD M et WALTON RE.

Principles and practices of endodontics.3^e ed.

Philadelphia: Saunders, 2002.

- 100. TRONSTAD L, ANDREASEN JO, HASSELGREN G et coll.**
pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide.
J Endod 1981 Jan;**7**(1):17-21.
- 101. TZIAFAS D.**
The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration.
Caries Res 2004 May-Jun;**38**(3):314-320.
- 102. TZIAFAS D, BELIBASAKIS G, VEIS A et coll.**
Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles.
Adv Dent Res 2001;**15**:96-100.
- 103. TZIAFAS D, PANTELIDOU O, ALVANOU A et coll.**
The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments.
Int Endod J 2002 Mar ;**35**(3):245-254.
- 104. TZIAFAS D, SMITH AJ et LESOT H.**
Designing new treatment strategies in vital pulp therapy.
J Dent 2000 Feb;**28**(2):77-92.
- 105. VEIS A, TOMPKINS K, ALVARES K et coll.**
Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo.
J Biol Chem 2000;**275**(52):41263-41272.
- 106. YANG X, ZHANG W, VAN DEN DOLDER J et coll.**
Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro.
J Tissue Eng Regen Med 2007;**1**(2):128-135.

107. YU J, WANG Y, DENG Z et coll.

Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells.

Biol Cell 2007 Aug;**99**(8):465-474.

108. ZHANG W, WALBOOMERS XF et JANSEN JA.

The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1.

J Biomed Mater Res A 2008 May;**85**(2):439-444.

THESE N°

BARBOTTIN Andréa -Données récentes sur la dentinogenèse de réparation.

Résumé de la thèse :

La pose d'hydroxyde de calcium lors d'une effraction de la pulpe dentaire induit la formation de dentine de réparation. Ce matériau demeure la référence comme agent de coiffage

direct malgré l'émergence du Minéral Trioxyde Aggregate et des résines adhésives.

Récemment, la stimulation de cellules souches/progéniteurs des odontoblastes de seconde génération grâce à certaines molécules bioactives a permis, expérimentalement,

l'induction de la formation de dentine de réparation. Ces techniques d'ingénierie tissulaire

pourraient à terme constituer une alternative à l'hydroxyde de calcium.

Rubrique de classement : ODONTOLOGIE
CONSERVATRICE

Domaine Bibliodent : ODONTOLOGIE CONSERVATRICE -
ENDODONTIE

Mots clés Bibliodent : Dentine tertiaire - Dentinogenèse -Coiffage direct-
Hydroxyde de

Calcium - Cellule souche.

MeSH : Dentisterie conservatrice, *operative dentistry*- coiffage pulpaire dentaire, *dental pulp*

capping -dentinogenèse, *dentinogenesis* - régénération, *régénération* - cellules souches, *stem*

cells.